

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANCON
Ecole Doctorale "Homme, Environnement, Santé"

ANNEE 2010 – N° 25-10-08

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Recherche Clinique, Innovation Technologique, Santé Publique

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 juin 2010

Par

Houssein GBAGUIDI-HAORE

**Surveillance inter-régionale
des bactéries multi-résistantes émergentes :
approches éco-épidémiologiques et moléculaires**

Directeur de thèse : Pr Xavier BERTRAND

Jury

Dr Jérôme ROBERT, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI	Rapporteur
Pr Philippe VANHEMS, Université Claude Bernard, Lyon	Rapporteur
Pr Jean-Christophe LUCET, Université Denis Diderot, Paris VII	Examinateur
Dr Daniel TALON, Université de Franche-Comté, Besançon	Examinateur
Pr Xavier BERTRAND, Université de Franche-Comté, Besançon	Directeur de thèse

Remerciements

Ces différents travaux ont été réalisés au sein du Service d'Hygiène Hospitalière du CHU de Besançon.

Mes remerciements vont au Docteur Daniel Talon pour son accueil dans le service et au Professeur Xavier Bertrand qui a assuré la direction de cette thèse.

Je remercie le Docteur Jérôme ROBERT et le Professeur Philippe VANHEMS d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Professeur Jean-Christophe LUCET d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci à tous les membres du Service d'Hygiène Hospitalière : Pascale, Michelle, les infirmières hygiénistes (Véronique, Catherine et Nathalie), Lucie (ma plus proche voisine de bureau, pour son aide précieuse lors de la mise au point de la MLST), les membres du RFCLIN (Nathalie, Lionel, Edith et Pierrette), Pascal, Françoise, les internes...

Merci aux autres membres de la fédération des laboratoires Bactériologie-Hygiène-Parasitologie pour leur collaboration.

Merci à tous...

A mes parents

Liste des articles

Articles publiés ou sous presse

GBAGUIDI-HAORE H, THOUVEREZ M, COUETDIC G, CHOLLEY P, TALON D, BERTRAND X. Usefulness of antimicrobial resistance pattern for detecting PVL- or TSST-1-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a French university hospital. *J Med Microbiol*, 2009, 58, p. 1337-1340.

GBAGUIDI-HAORE H, LEGAST S, THOUVEREZ M, BERTRAND X, TALON D. Ecological Study of the Effectiveness of Isolation Precautions in the Management of Hospitalized Patients Colonized or Infected With *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29, p. 1118-1123.

GBAGUIDI-HAORE H, TALON D, THOUVEREZ M, MENGET A, BERTRAND X. Molecular epidemiology of *Enterobacter cloacae* in a neonatal department: a 2-year surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008, 27, p. 643-648.

CHOLLEY P, **GBAGUIDI-HAORE H**, BERTRAND X, THOUVEREZ M, HOCQUET D, PLESIAT P, TALON D. Molecular epidemiology of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Journal of Hospital Infection*, 2010, sous presse.

Articles soumis

GBAGUIDI-HAORE H, CHOLLEY P, RABAUD C, BERTRAND X, TALON D. Multilevel modelling of the prevalence of hospitalized patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*. (soumis à *Epidemiology and Infection*, décembre 2009).

JOCHAULT L, **GBAGUIDI-HAORE H**, SLEKOVEC C, TALON D, THOUVEREZ M, BERTRAND X. Using time-series analysis to evaluate control measures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (soumis à *Infection Control and Hospital Epidemiology*, mars 2010).

Liste des abréviations

ACF	Autocorrelation function
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARIMA	Autoregressive integrated moving average
BLSE	β -lactamase à spectre étendu
BMR	Bactérie multi-résistante
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DDJ	Dose définie journalière
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
ERG	Entérocoques résistants aux glycopeptides
IAS	Infections associées aux soins
MLST	Multilocus sequence typing
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PACF	Partial autocorrelation function
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PVL	Leucocidine de Panton-Valentine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
TSST-1	Toxine-1 du syndrome de choc toxique

Liste des figures

Figure 1. Emergence de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant aux antibiotiques (d'après Deleo <i>et al.</i> [33]).-----	19 -
Figure 2. Evolution de la proportion (%) des souches SARM au sein de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> dans différents pays européens entre 2003 et 2008 (d'après EARSS, http://www.rivm.nl/earss/database/).-----	20 -
Figure 3. Situation épidémiologique d' <i>Escherichia coli</i> BLSE dans le monde en 2000-2001, 2005 et 2007.-----	24 -
Figure 4. Pays qui ont rapporté des épidémies d' <i>Acinetobacter baumannii</i> carbapénème-résistant avant 2006 (en rouge) et à partir de 2006 (en jaune) (d'après [81])-----	31 -
Figure 5. Exemples de structures de données multiniveaux. -----	39 -
Figure 6. Effets écologiques -----	41 -
Figure 7. Modèle linéaire classique -----	43 -
Figure 8. Modèle multiniveau à coefficient fixe -----	43 -
Figure 9. Modèle multiniveau à coefficient aléatoire-----	43 -
Figure 10. Série stationnaire -----	48 -
Figure 11. Série non stationnaire (tendance croissante) -----	48 -
Figure 12. Série non stationnaire (saisonnalité) -----	48 -
Figure 13. Modèle AR(2,3) I(0) MA(0)-----	50 -
Figure 14. Modèle AR(0) I(0) MA(1,2)-----	50 -
Figure 15. Modèle non différencié-----	50 -
Figure 16. Modèle après différenciation AR(2,3) I(1) MA(0)-----	50 -
Figure 17. Amplification d'une séquence par PCR-----	54 -
Figure 18. Principe de l'analyse PFGE-----	56 -
Figure 19. Principe de l'analyse MLST -----	58 -
Figure 20. Evolution mensuelle entre 1999 et 2006 du taux d'incidence des patients colonisés ou infectés par <i>Acinetobacter baumannii</i> et de la consommation des antibiotiques J01 ((a) sans décalage et (b) avec un décalage de 5 mois) Recommandation ou non des précautions complémentaires.-----	71 -

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques des souches SARM en France -----	22 -
Tableau II. Caractéristiques des infections à EBLSE (d'après Pitout <i>et al.</i> [6])-----	26 -
Tableau III. Types d'études épidémiologiques en fonction des échelles (d'après Diez-Roux et Aiello [151]) -----	39 -
Tableau IV. Classification des variables écologiques (d'après Blakely et Woodward [154])-----	41 -
Tableau V. Critères d'interprétation des profils de macrorestriction génomique générés par PFGE (d'après Tenover <i>et al.</i> [169])-----	56 -

SOMMAIRE

Remerciements	- 2 -
Liste des articles	- 3 -
Liste des abréviations	- 4 -
Liste des figures	- 5 -
Liste des tableaux	- 6 -
SOMMAIRE	- 7 -
INTRODUCTION	- 11 -
1^{ère} PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE	- 14 -
1. Bactéries multi-résistantes	- 15 -
1.1. Définition	- 15 -
1.2. Mécanismes et supports génétiques impliqués	- 16 -
2. Emergence / réémergence	- 18 -
2.1. SARM communautaire (SARM-C)	- 18 -
2.1.1. Généralités sur le SARM	- 18 -
2.1.2. Emergence et diffusion globale du SARM-C	- 21 -
2.1.3. Intrusion et implantation du SARM-C dans le cadre hospitalier	- 23 -
2.2. Souches d' <i>Escherichia coli</i> productrices de BLSE	- 23 -
2.2.1. Généralités sur les entérobactéries productrices de BLSE	- 23 -
2.2.2. Diffusion du clone intercontinental <i>E. coli</i> O25 : H4-ST131	- 27 -
2.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> multi-résistant	- 28 -
2.3.1. Généralités sur <i>Acinetobacter baumannii</i>	- 28 -
2.3.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	- 28 -
2.3.3. Epidémiologie globale	- 29 -
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-résistant	- 31 -
2.4.1. Généralités sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 31 -
2.4.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	- 32 -
2.4.3. Epidémiologie globale	- 33 -
3. Outils méthodologiques	- 35 -
3.1. Surveillance épidémiologique	- 35 -
3.2. Approches éco-épidémiologiques	- 36 -
3.2.1. Généralités	- 36 -
3.2.2. Analyse multiniveau	- 38 -
3.2.2.1. Définition de l'approche multiniveau	- 38 -
3.2.2.2. Les variables dans l'analyse multiniveau	- 40 -
3.2.2.3. Modélisation multiniveau	- 42 -
3.2.3. Analyse des séries temporelles	- 45 -
3.2.3.1. Définition d'une série temporelle	- 45 -

3.2.3.2.	L'auto-corrélation temporelle	46 -
3.2.3.3.	La stationnarité	46 -
3.2.3.4.	L'analyse univariée	49 -
3.2.3.5.	L'analyse multivariée	51 -
3.3.	Epidémiologie moléculaire	53 -
3.3.1.	Techniques utilisant la PCR	53 -
3.3.2.	Analyse de macrorestriction de l'ADN total par l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis)	55 -
3.3.3.	Typage par séquençage multilocus (MLST, MultiLocus Sequence Typing)	57 -
2^{ème}	PARTIE : TRAVAUX	59 -
1.	Etude 1 – Intérêt du profil de résistance aux antibiotiques dans la détection de souches de SARM productrices de toxines PVL ou TSST-1.	61 -
1.1.	Présentation de l'étude	61 -
1.2.	Conclusion	61 -
1.3.	Texte de l'article	62 -
2.	Etude 2 – Etude écologique de l'efficacité des précautions complémentaires dans la gestion des patients colonisés ou infectés par <i>Acinetobacter baumannii</i>	69 -
2.1.	Présentation de l'étude	69 -
2.2.	Conclusion	70 -
2.3.	Texte de l'article	71 -
3.	Etude 3 – Utilisation de l'analyse des séries temporelles pour évaluer les mesures de contrôle de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la pénicilline	78 -
3.1.	Présentation de l'étude	78 -
3.2.	Conclusion	78 -
3.3.	Texte de l'article	79 -
4.	Etude 4 – Modélisation multiniveau de la prévalence des patients infectés par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans les établissements de santé de l'Est de la France	99 -
4.1.	Présentation de l'étude	99 -
4.2.	Conclusion	100 -
4.3.	Texte de l'article	101 -

5. Etude 5 – Epidémiologie moléculaire de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multi-résistant dans un hôpital universitaire	122 -
5.1. Présentation de l'étude	122 -
5.2. Conclusion	122 -
5.3. Texte de l'article	123 -
6. Etude 6 – Epidémiologie moléculaire de <i>Escherichia coli</i> producteur de β-lactamase à spectre étendu dans l'inter-région Est	140 -
6.1. Présentation de l'étude	140 -
6.2. Conclusion	140 -
6.3. Texte du rapport	141 -
7. Autre étude – Epidémiologie moléculaire de <i>Enterobacter cloacae</i> dans un service de néonatalogie : un programme de surveillance de deux ans	154 -
7.1. Présentation de l'étude	154 -
7.2. Conclusion	154 -
7.3. Texte de l'article	155 -
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	162 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165 -

INTRODUCTION

Dès son discours de remerciements, lors de la remise du prix Nobel de médecine en décembre 1945, Alexander Fleming mettait en garde contre le mésusage de sa découverte (pénicilline), notamment en ce qui concerne la sélection de bactéries résistantes [1]. La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques limite considérablement les options d'antibiothérapies en pratique clinique, pouvant aller jusqu'à l'impasse thérapeutique. Ces bactéries constituent, de fait, un problème majeur de santé publique, d'autant plus que peu de nouvelles molécules sont mises sur le marché. La fin des années 1990 et les années 2000 ont vu l'émergence et la diffusion mondiale de souches particulières de ces bactéries "labellisées" multi-résistantes (BMR). Ainsi, des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline dites communautaires (SARM-C) ont émergé [2] et sont à l'origine d'infections chez des patients ne présentant aucun des facteurs de risque habituels d'acquisition du SARM (antécédents d'hospitalisation...). Ces souches SARM-C diffèrent des souches hospitalières typiques (SARM-H) à bien des égards, notamment, sur le plan de l'expression clinique, des caractéristiques phénotypiques et génotypiques [2, 3]. De même, parmi les entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (EBLSE) et plus particulièrement *Escherichia coli*, l'émergence du clone intercontinental O25 : H4-ST131 [4], producteur d'une BLSE de type CTX-M-15 constitue aujourd'hui un problème préoccupant [5, 6]. Ce clone, responsable d'infections urinaires et de bactériémies a largement diffusé au sein de la communauté et est impliqué de plus en plus dans des infections en milieu hospitalier. Un autre phénomène émergent remarquable est celui des entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG). En effet, si les ERG (*Enterococcus faecium* et plus rarement *E. faecalis*) sont aujourd'hui bien implantés aux Etats-Unis (années 1990) [7], l'émergence de ces BMR en Europe est plus récente [8]. En France, c'est seulement depuis 2005 que l'on assiste à une recrudescence d'épidémies hospitalières impliquant des souches appartenant au complexe clonal 17 (CC17) [9], dont la diffusion est mondiale. Toutefois, ces épidémies restent encore limitées à quelques régions (inter-régions Paris-Nord et Est surtout). Outre les risques de leur diffusion et de leur implantation durable dans les hôpitaux français, la problématique majeure concernant les ERG tient moins dans leur pathogénicité (faible virulence) que dans le risque de transfert de gènes de résistance (*vanA* principalement) des ERG vers le SARM [10], à la faveur d'une co-colonisation chez les patients. D'autres phénomènes de multi-résistance allant jusqu'à la pan-résistance (résistance à tous

les antibiotiques disponibles) ont été observés chez *Acinetobacter baumannii* [11] et *Pseudomonas aeruginosa* [12]. Ainsi, plusieurs auteurs ont tiré la sonnette d'alarme face à l'imminence de l'ère "post-antibiotique" [13-15], notamment pour les espèces bactériennes appartenant au groupe dénommé "**ESKAPE**" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* spp.) dont certaines sont en passe d'échapper à l'arsenal des antibiotiques disponibles. De telles menaces peuvent à la fois émerger et diffuser de l'hôpital vers la communauté ou apparaître au niveau communautaire et s'implanter au sein des hôpitaux. Ainsi, pour faire face au défi que constituent ces phénomènes émergents, les établissements de santé se doivent de mettre en place des stratégies de surveillance, de contrôle et de prévention. Ces actions impliquent une collaboration pluridisciplinaire associant des infectiologues, des microbiologistes, des hygiénistes et des épidémiologistes pour faire barrage et retarder l'échéance sombre que constitue un retour à l'ère "pré-antibiotique".

L'objectif de cette thèse était de caractériser un certain nombre de phénomènes émergents de multi-résistance à l'échelle d'un hôpital universitaire régional ou de l'inter-région Est. A cette fin, nous avons procédé à la mise œuvre d'approches éco-épidémiologiques et moléculaires.

L'exposé de ce travail se décomposera en deux parties :

- une première partie introductive dans laquelle nous réaliserons une brève revue de la littérature sur les problématiques posées par chacune de ces bactéries, ainsi qu'une présentation des outils méthodologiques utilisés dans le cadre de cette thèse (modélisation statistique, épidémiologie moléculaire) ;
- et une seconde partie, où nous présenterons un certain nombre de travaux illustrant la surveillance de ces bactéries à l'échelle d'un hôpital universitaire régional ou de l'inter-région Est.

1^{ère} PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

1. Bactéries multi-résistantes

1.1. Définition

"Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutiques" *dixit* le Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN, InVS, France) [16]. Un simple parcours des données de la littérature médicale et scientifique nous conduit à une évidence, l'absence de définition universelle ou consensuelle de la notion de multi-résistance aux antibiotiques. En effet, à l'exception de *Mycobacterium tuberculosis*, pour lequel une définition admise au niveau international existe (résistance à l'isoniazide et à la rifampicine) [17], celles relatives aux autres bactéries varient largement dans l'espace et dans le temps. A cela, s'ajoute l'introduction de nouveaux termes pour décrire la magnitude de la multi-résistance : "Multidrug resistant" [MDR], "Extensively drug-resistant" [XDR] et "pandrug resistant" [PDR]. En effet, ces termes présentent différentes nuances du spectre de la multi-résistance aux antibiotiques qui va d'une définition minimale (c.-à-d., résistance à au moins trois classes majeures d'antibiotiques) en passant par un niveau intermédiaire (notion d'ultra-résistance, résistance à tous les antibiotiques à l'exception d'une ou deux classes) jusqu'à un niveau maximal (c.-à-d., résistance à toutes les classes d'antibiotiques). Cette question de la disparité des définitions des BMR se pose particulièrement pour *A. baumannii* et *P. aeruginosa* comme l'ont rapporté Falagas *et al.* [18, 19]. En effet, cela complique considérablement la comparaison de l'épidémiologie de ces BMR dans les différentes régions du globe. Les auteurs plaident pour une harmonisation de la définition de ces termes, notamment du terme "pan-résistant ou toto-résistant" (résistance à tous les antibiotiques ± la colistine selon les auteurs). Actuellement, pour ces deux bactéries la définition du terme multi-résistant la plus souvent usitée correspond à la résistance à au moins trois des cinq classes d'antibiotiques suivantes : (i) céphalosporines anti-pyocyaniques (ceftazidime ou céfépime), (ii) carbapénèmes antipyocyaniques (imipénème ou méropénème), (iii) (pipéracilline-tazobactam ou ticarcilline-acide clavulanique ou [pour *A. baumannii*] ampicilline-

sulbactam), (iv) fluoroquinolones (ciprofloxacine ou lévofloxacine), et (v) aminoglycosides (gentamicine ou tobramycine ou amikacine). Toutefois, avec l'augmentation de l'utilisation des polymyxines (colistine) et peut-être de la tigécycline, cette définition devra intégrer ces autres molécules. Pour d'autres bactéries qui ont le "label" de BMR (SARM, EBLSE et ERG), la question de la définition ne se pose pas.

1.2. Mécanismes et supports génétiques impliqués

La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est la résultante de l'association de résistances naturelles et acquises. Ces résistances font intervenir trois grands types de mécanismes : (i) inactivation enzymatique de l'antibiotique, (ii) imperméabilité et systèmes d'efflux et (iii) modification de la cible de l'antibiotique.

Le chromosome bactérien est le support génétique de la résistance naturelle. Celle-ci est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) mais pas ou peu transmise sur un mode horizontal. Sur le plan génétique, les mécanismes responsables de résistances acquises sont de deux types, la mutation chromosomique et le transfert génétique extra-chromosomique (plasmides, éléments génétiques transposables, intégrons). La mutation ponctuelle dans le chromosome bactérien a pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique, elle est stable et a un caractère héréditaire (transmission sur un mode vertical). Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomique mobiles ; ils constituent l'un des principaux éléments générateurs de multi-résistance, portant souvent plusieurs gènes de résistance transférés par un mécanisme de conjugaison d'une bactérie à l'autre. Les éléments génétiques transposables (transposons) et les intégrons inclus dans les transposons assurent la dissémination de gènes entre bactéries phylogénétiquement éloignées en permettant l'implantation d'un gène là où celle d'un plasmide échoue. Les intégrons sont des éléments génétiques capables d'accumuler de façon séquentielle des gènes de résistance sous forme de cassettes qui sont des éléments mobiles. Ainsi, par l'intermédiaire des plasmides, des transposons et des intégrons les résistances se transmettent d'une bactérie à une autre pas nécessairement de la même espèce (transmission

horizontale). Outre la conjugaison, ces transferts génétiques extra-chromosomiques peuvent être réalisés par transduction (transfert par l'intermédiaire d'un bactériophage) et par transformation (pénétration dans une bactérie réceptrice d'ADN libre). C'est l'accumulation de résistances au sein d'une même espèce bactérienne qui conduit à sa multi-résistance.

2. Emergence / réémergence

L'organisation mondiale de la santé (OMS) [20] définit comme maladie émergente ou ré-émergente "une maladie qui apparaît pour la première fois au sein d'une population donnée, ou qui y était déjà présente mais qui augmente rapidement et significativement en incidence ou dans sa diffusion géographique".

Ainsi, à la lumière de cette définition, la notion de BMR émergentes correspond à l'apparition d'une bactérie présentant un mécanisme de résistance nouveau au sein d'une population donnée, ou si elle était déjà présente son augmentation significative dans le temps et/ou dans l'espace.

2.1. SARM communautaire (SARM-C)

2.1.1. Généralités sur le SARM

Staphylococcus aureus est une bactérie ubiquitaire commensale fréquemment isolée de la flore humaine. Cette espèce bactérienne est très souvent impliquée dans des processus infectieux qu'ils soient d'origine communautaire ou hospitalière. *S. aureus* est responsable d'une grande variété d'infections, allant des lésions superficielles aux infections systémiques mettant en jeu le pronostic vital du patient [21]. Ce micro-organisme a une grande capacité d'adaptation aux antibiotiques, et progressivement, il est devenu résistant à de nombreux antibiotiques. Dans cette progression vers la multi-résistance (**Figure 1**), l'apparition de souches de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) au début des années 60, par acquisition du gène *mecA* qui code pour une protéine liant la pénicilline modifiée (PBP2a) et est inclus dans la cassette *SCCmec* (staphylococcal chromosome cassette *mec*) fut une étape décisive. Cette acquisition se serait faite à partir d'une souche de *Staphylococcus sciuri* [22-24]. Plus récemment, la description des premières souches de SARM résistantes aux glycopeptides fait craindre la dissémination de souches échappant à l'arsenal d'antibiotiques disponibles à l'heure actuelle [25, 26]. Au cours des quatre décennies qui ont suivies son émergence, le SARM s'est propagé sur l'ensemble du globe et est devenu endémique dans la plupart des grandes aires géographiques et

notamment en France [27]. Ce pathogène est responsable d'une mortalité et d'une morbidité très importante [28, 29]. Au début de l'endémie, les souches de SARM étaient principalement retrouvées dans les hôpitaux universitaires et dans les services de réanimation, où les patients colonisés ou infectés représentaient une source importante de transmission croisée. A l'heure actuelle, le SARM est l'un des pathogènes les plus communément isolés dans les hôpitaux de différents types et de tailles variables [30, 31]. Il est établi que les patients colonisés ou infectés constituent le réservoir principal de ce pathogène et que le portage transitoire sur les mains du personnel soignant représente le mécanisme principal de transmission d'un patient à un autre [32].

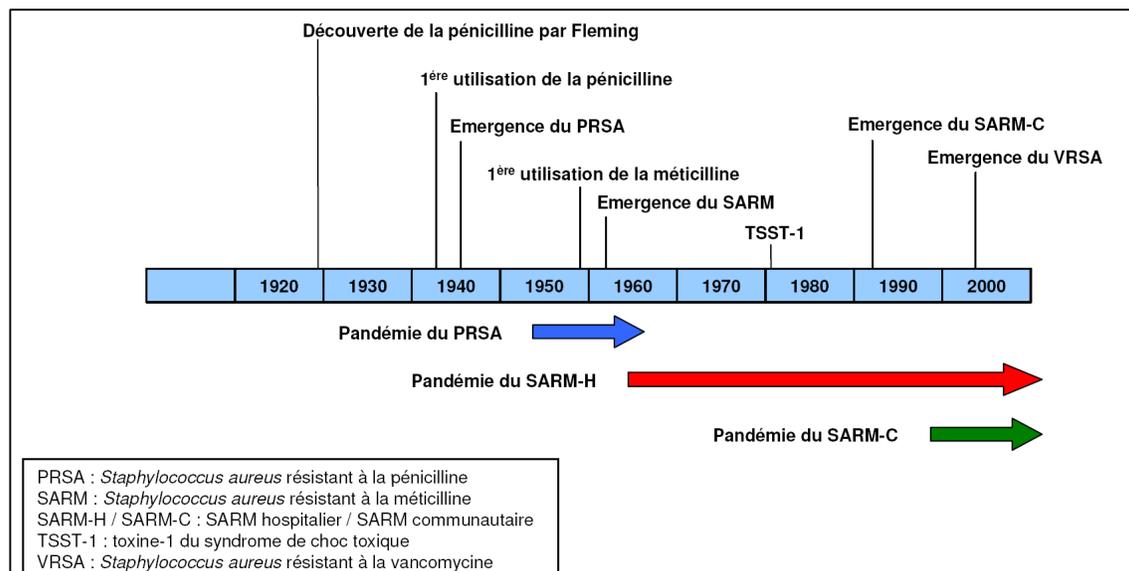


Figure 1. Emergence de *Staphylococcus aureus* résistant aux antibiotiques (d'après Deleo *et al.* [33]).

Depuis la fin des années 2000 et pour la première fois, la proportion du SARM au sein de l'espèce semble se stabiliser et même baisser dans beaucoup de pays européens. Le système de surveillance européen EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) rapporte cependant d'importantes différences géographiques [34]. Pour les pays de faible endémicité (Scandinavie) qui montraient jusqu'il y a peu encore une tendance croissante, cette proportion semble se

stabiliser. En revanche, elle reste élevée (> 50%) au Portugal (augmentation entre 2007 et 2008) et à Malte (**Figure 2**). La diminution la plus remarquable concerne la France, comme le confirme les données de la surveillance nationale [16] avec une diminution constante du taux d'incidence (/1000 jours d'hospitalisation) des SARM (colonisations/infections) entre 2003 et 2007 : 0,68 en 2003 ; 0,62 en 2004 ; 0,58 en 2005 ; 0,55 en 2006 et 0,48 en 2007.

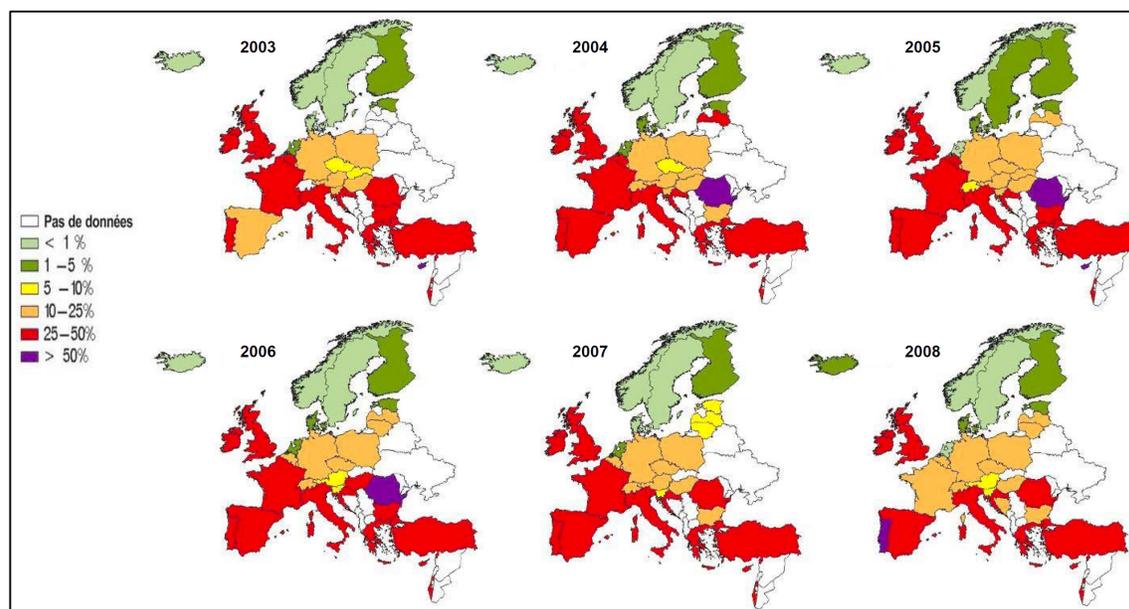


Figure 2. Evolution de la proportion (%) des souches SARM au sein de l'espèce *Staphylococcus aureus* dans différents pays européens entre 2003 et 2008 (d'après EARSS, <http://www.rivm.nl/earss/database/>).

Cette tendance globale de contrôle au niveau européen du problème du SARM semble être soutenue par une étude récente relative à la distribution géographique des clones de SARM impliqués dans des infections invasives [35]. En effet, cette étude montrait que les "spa types" du SARM à la différence du SASM (*Staphylococcus aureus* sensible à la pénicilline) ont une diffusion principalement limitée à l'échelle des réseaux régionaux de santé. Selon les auteurs, ce résultat suggère que l'objectif d'efficacité *in fine* des politiques de contrôle de la diffusion du SARM au sein et entre les établissements de santé était à notre portée et devrait être encouragé.

2.1.2. Emergence et diffusion globale du SARM-C

Au cours de ces deux dernières décennies sont apparues de nouvelles menaces sur le front de la lutte contre le SARM. L'émergence et la diffusion globale [2, 36] de souches de SARM dites "communautaires" (SARM-C) chez des patients ne présentant pas les facteurs de risque habituels de portage du SARM (antécédents récents d'hospitalisation ou de chirurgie, séjour dans un établissement de long séjour, dialyse, dispositifs intra-vasculaires et sonde urinaire à demeure...) est un nouveau défi à relever [37, 38]. La distribution géographique de ces souches est très variable ; elles sont plus fréquentes aux Etats-Unis qu'en Europe et en Asie, où elles restent rares. Ces souches ont récemment acquis une cassette *SCCmec* de type IV ou V, l'îlot de pathogénicité SaPI3, et le bactériophage Sa2 dans leur évolution à partir de souches SASM476 [39]. Leur virulence est principalement liée à la production d'une toxine, la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) codée par les bactériophages. Plusieurs auteurs ont démontré que les souches de SARM-C peuvent avoir évolué de clones SASM possédant les gènes de la PVL par insertion de *SCCmec* IV [40-42]. Les souches de SARM-C diffèrent des souches SARM-H sur plusieurs plans, à la fois microbiologiques et épidémiologiques. Les souches SARM-C appartiennent à des lignées phylogénétiques distinctes ; cinq sont actuellement retrouvées dans le monde : ST1-IV (USA400), ST8-IV (USA300), ST30-IV (Pacifique/Océanie), ST59-IV et V (USA1000, Taiwan) et ST80-IV (Européen) [43].

Tableau I. Caractéristiques des souches SARM en France

	SARM "hospitalier"	SARM "communautaire"
Acquisition	Hospitalière	Communautaire
Age moyen	> 60 ans	20-30 ans
Facteur de risque principal	Antécédents d'hospitalisation	Faible niveau socio-économique
Types d'infections	Infections du site opératoire, bactériémies, infections urinaires	Infections cutanées purulentes, pneumonies nécrosantes mortelles chez les jeunes enfants
Phénotype résistance	Fluoroquinolone-Résistant	Fluoroquinolone-Sensible
Gène <i>mecA</i>	Présence	Présence
Sequence type (MLST)	ST8 / ST5	ST80
Type <i>agr</i>	1/ 2	3
SCC <i>mec</i>	IV	IV
Gène PVL	Absence	Présence

Ces souches SARM-C possèdent les caractéristiques suivantes : (i) elles sont détectées chez des patients sans antécédent d'hospitalisation, elles sont acquises, pour la plupart, en dehors de toute structure hospitalière, (ii) le phénotype de sensibilité aux familles d'antibiotiques autres que les β -lactamines des SARM-C (sensibles à plusieurs familles) est différent de celui des SARM-H (résistantes à plusieurs familles), (iii) ces souches produisent la PVL et sont responsables d'infections cutanées purulentes sans porte d'entrée apparente et de pneumonies nécrosantes mortelles chez les jeunes enfants, (iv) enfin, ces souches sont isolées préférentiellement dans des populations de faible niveau socio-économique. Les caractéristiques de ces souches sont comparées à celles des souches hospitalières françaises dans le **tableau I**. Il existe plusieurs clones, mais un clone prédomine actuellement en France (ST80-IV). Par ailleurs, on a assisté ces dernières années à la diffusion en France et en Suisse d'un clone de SARM producteur de la toxine-1 du syndrome de choc toxique (TSST-1, toxine superantigénique) impliqué dans des infections en partie d'acquisition communautaire [44, 45]. L'introduction et l'implantation de ces souches dans le cadre hospitalier constituent un véritable défi en termes de diagnostic, de traitement et de contrôle des infections.

2.1.3. Intrusion et implantation du SARM-C dans le cadre hospitalier

De nombreuses publications récentes rapportent d'authentiques infections associées aux soins (IAS) causées par des souches SARM-C [46-48]. Notamment, aux Etats-Unis, dans les pays du bassin méditerranéen, mais aussi dans les pays nordiques de faible endémicité à SARM, où les cas d'IAS à SARM impliquent principalement des souches SARM-C [49, 50]. Certains auteurs ont même évoqué le fait que les souches SARM-C pourraient supplanter les souches SARM-H traditionnelles dans l'avenir [51].

2.2. Souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE

2.2.1. Généralités sur les entérobactéries productrices de BLSE

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) sont des enzymes bactériennes qui inactivent la plupart des β -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes. Elles constituent le principal mécanisme de résistance acquise aux β -lactamines chez les entérobactéries. Souvent associées à des résistances à d'autres familles d'antibiotiques, elles restreignent considérablement les possibilités thérapeutiques. Compte tenu de l'impact clinique majeur des entérobactéries et notamment, de l'espèce *Escherichia coli*, la large diffusion de ce type d'enzyme constitue une menace majeure en matière de santé publique. En Europe, jusqu'à la fin des années 1990, la plupart des BLSE des entérobactéries étaient de type TEM ou SHV, alors que les principales espèces d'entérobactéries productrices étaient *K. pneumoniae* et *E. aerogenes*. Depuis quelques années, cette situation a radicalement changé. A l'heure actuelle, les souches de *E. coli* productrices de CTX-M (**C**efo**TaX**imase, isolée pour la première fois à **M**unich) représentent la majorité des EBLSE et sont retrouvées dans tous les types de services hospitaliers [6]. Mis à part l'Amérique du Nord où les enzymes de type TEM et SHV semblent encore majoritaires, les CTX-M sont endémiques en Amérique Latine, au Japon et dans certains pays d'Europe de l'Est. En Europe de l'Ouest, dont la France, on note une importante dissémination de ce type de BLSE [52, 53] (**Figure 3**).

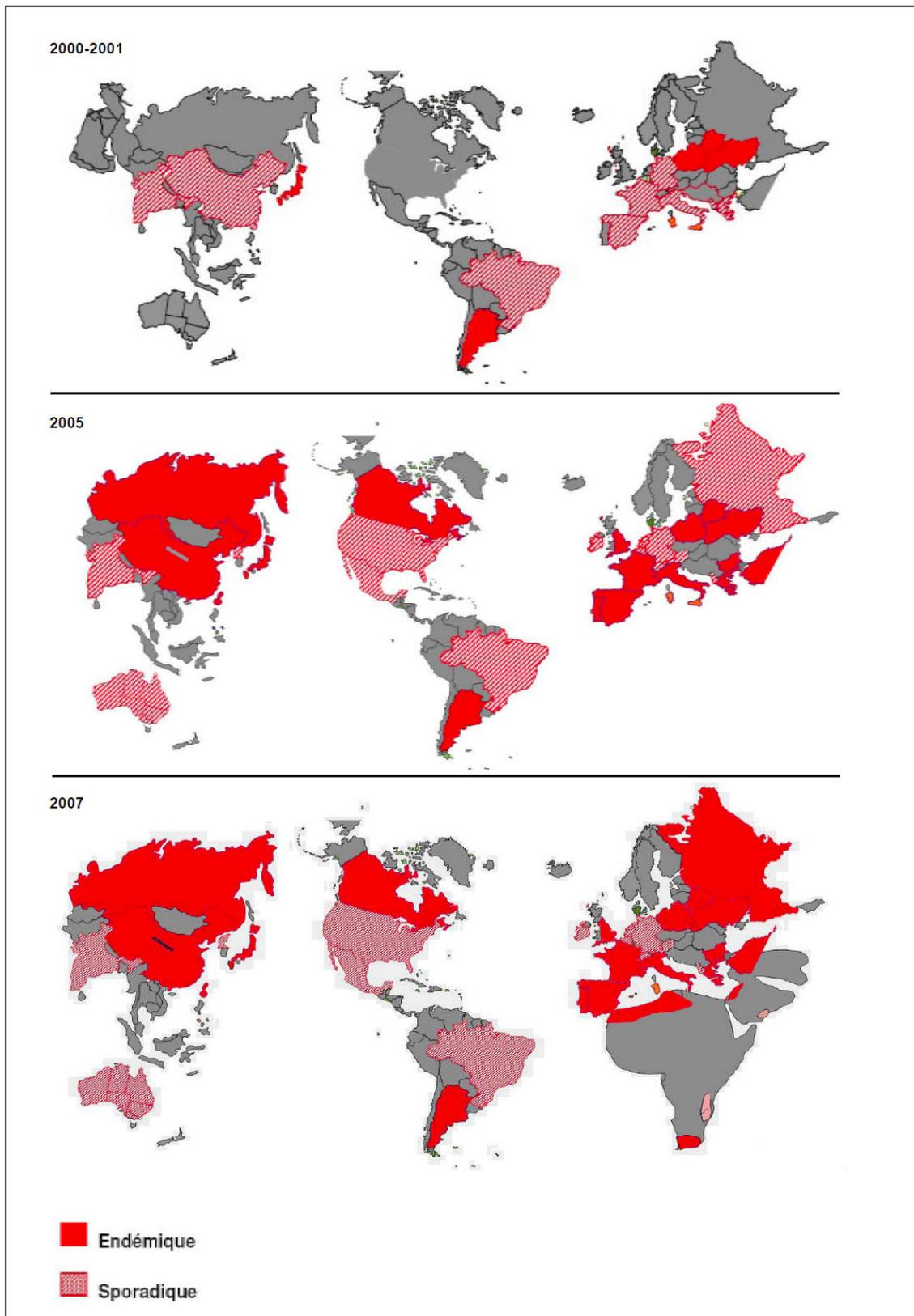


Figure 3. Situation épidémiologique d'*Escherichia coli* BLSE dans le monde en 2000-2001, 2005 et 2007.

En Amérique du Sud, notamment en Argentine, l'enzyme de type CTX-M-2 est la plus souvent décrite chez les entérobactéries et tout particulièrement chez *E. coli*. En Asie, les CTX-M ont émergé depuis 1995 et sont devenues prédominantes : CTX-M-9 et CTX-M-14 au Japon [54], CTX-M-14, CTX-M-13, CTX-M-9 et CTX-M-3 en Chine, CTX-M-14 en Corée et au Vietnam et CTX-M-15 et -3 en Inde. Les BLSE de type CTX-M les plus fréquentes sont CTX-M-15, devant CTX-M-1 et CTX-M-3 dans plusieurs pays d'Europe [55, 56]. Dans certains autres pays, d'autres types d'enzymes sont plus souvent rencontrées chez *E. coli*, comme CTX-M-9 en Espagne [57]. Des études espagnoles, hongroises, finlandaises, mais aussi françaises rapportent également des épidémies importantes liées à des clones hospitaliers de *K. pneumoniae* producteurs de CTX-M-15 [58-60]. L'épidémiologie française ne fait pas exception en matière de prédominance progressive des enzymes CTX-M. A partir des années 2000, ces enzymes ont émergé surtout dans le nord de la France. La présence de CTX-M-15 chez *K. pneumoniae* a aussi été rapportée dans d'autres hôpitaux français [61]. L'étude menée en 2004 en Champagne-Ardenne montrait que les enzymes de type CTX-M représentaient 45% des BLSE chez les entérobactéries ; et dans l'espèce *E. coli*, CTX-M-15 représentait 52% des BLSE [62]. L'origine communautaire des infections à *E. coli* BLSE a été démontrée dans différents pays ; en Espagne [63, 64], en Italie [65], en Grande Bretagne [66], au Canada [67] et en France [68]. Certaines de ces études qui évaluaient la proportion des cas communautaires, indiquaient qu'elle variait de façon importante d'une étude à l'autre, de 13 à 72%. La difficulté d'interprétation des résultats de ces études résidait dans la diversité des définitions du caractère communautaire des cas qui ne sont pas consensuelles. Ces définitions reposaient soit sur la seule information d'un délai inférieur à 48 heures entre la survenue du cas et l'hospitalisation, soit sur l'absence d'antécédents d'hospitalisation durant des périodes très variables selon les auteurs : de 2 semaines à 10 ans [69-72]. Plusieurs études ont identifié des facteurs de risque d'infection à *E. coli* BLSE : âge, sexe féminin, existence de co-morbidités, diabète, infections urinaires récidivantes, sondage urinaire, chirurgie gynécologique, contexte nosocomial, antécédents d'hospitalisation, de traitement par β -lactamines ou fluoroquinolones [6] (**Tableau II**). A l'échelle de la France, l'épidémiologie des EBLSE a été profondément modifiée au cours des années 2000 par l'émergence, puis la large dissémination de souches de *E. coli* productrices d'enzymes de type CTX-M. Ces enzymes risquent maintenant de diffuser chez les autres espèces

d'entérobactéries, en particulier *Klebsiella pneumoniae*. Les souches de *E. coli* productrices de BLSE de type TEM ou SHV sont, à l'heure actuelle, largement minoritaires et semblent demeurer au faible niveau endémique qui était le leur au début des années 2000 [73]. Les résultats de la surveillance nationale des BMR 2007 [16] indiquent une augmentation importante de *E. coli* BLSE aussi bien en taux d'incidence (/1000 jours d'hospitalisation), de 0,02 en 2002 à 0,11 en 2007 qu'en part relative au sein des entérobactéries productrices de BLSE, de 18,5% en 2002 à 48,5% en 2007. Inversement, la part relative de *K. pneumoniae* et d'*Enterobacter aerogenes* BLSE a diminué, avec une baisse du taux d'incidence de *E. aerogenes* BLSE. Il faut aussi noter une augmentation du taux d'incidence d'*Enterobacter cloacae* BLSE.

Tableau II. Caractéristiques des infections à EBLSE (d'après Pitout *et al.* [6])

Acquisition	“Hospitalière”	“Communautaire”
Micro-organisme	<i>Klebsiella</i> spp. (et autres)	<i>Escherichia coli</i>
Type de BLSE	SHV (SHV2, SHV5) et TEM (TEM26, TEM51)	CTX-M (CTX-M-15)
Types d'infections	Infections respiratoires, digestives, bactériémies	Infections urinaires +++, bactériémies, gastro-entérites
Phénotype de résistance	Pénicillines et céphalosporines, fluoroquinolones, co-trimoxazole.	Pénicillines et céphalosporines, fluoroquinolones, co-trimoxazole.
Epidémiologie moléculaire	Diffusion clonale le plus souvent.	Isolats non liés génotypiquement en générale
Facteurs de risque	Durée d'hospitalisation, score de gravité élevé, durée de séjour en réanimation, intubation/ventilation mécanique, cathétérisme urinaire et artériel, exposition préalable aux antibiotiques (céphalosporines)	Infections urinaires récidivantes, pathologies rénales et hépatiques sous-jacentes, exposition préalable aux céphalosporines et aux fluoroquinolones, antécédents d'hospitalisation, diabète, âge élevé, sexe féminin

2.2.2. Diffusion du clone intercontinental *E. coli* O25 : H4-ST131

Les années 2000 ont vu émerger et diffuser globalement le clone *E. coli* CTX-M-15 O25:H4-ST131 [4, 53] qui fait partie du groupe phylogénétique B2, groupe des souches les plus virulentes parmi les souches extra-intestinales. De nombreuses études européennes, dont françaises, démontrent la diffusion de ce clone, attestant de son épidémiogénicité, de sa virulence et de sa multi-résistance [4, 74, 75]. Dans l'inter-région Est, le génotypage par électrophorèse en champ pulsé de 196 souches de *E. coli* BLSE, isolées en 2006 et 2007 dans 20 hôpitaux, révèle que ce clone épidémique majeur O25 : H4-ST131 représente 32 % des souches de *E. coli* productrice de CTX-M 15 (données non publiées C. de Champs *et al.*). La diffusion de CTX-M-15 est donc associée à la diffusion de clones, mais aussi à la diffusion de plasmides contenant le gène *bla*_{CTX-M-15}. Des plasmides épidémiques ont été identifiés en Europe (Espagne, France, Portugal, Royaume-Uni), en Afrique et en Amérique du Nord (Canada) [76-78].

En résumé, l'épidémiologie de *E. coli* BLSE est complexe : (i) l'acquisition nosocomiale est fréquente, (ii) la diffusion communautaire est certaine, (iii) parmi les infections nosocomiales, il est difficile de différencier les cas d'origine exogène (le patient acquiert la bactérie au cours de son hospitalisation par transmission croisée) des cas d'origine endogène (l'infection survient à partir d'une souche présente chez le patient préalablement à l'hospitalisation, suite à des facteurs de risque nosocomiaux), (iv) la diffusion de plasmides entre des souches génotypiquement différentes de *E. coli* et entre espèces d'entérobactéries est probable, (v) la diffusion du clone O25 : H4-ST131 rend difficile la distinction entre acquisition nosocomiale et acquisition communautaire. Le succès des souches de *E. coli* BLSE dépend de la transmission interhumaine en milieu de soins et dans la communauté ainsi que de la pression de sélection antibiotiques. Les hôpitaux sont confrontés à une importation de souches de *E. coli* BLSE et au risque de transmission au sein de l'hôpital, ce qui augmente le portage dans la population hospitalière, puis en conséquence le portage dans les populations communautaires. La transmission au sein de la communauté amplifie encore le phénomène. Le contrôle des entérobactéries BLSE, et singulièrement de *E. coli* BLSE, impose de mettre en place à la fois (a) des mesures visant à réduire la diffusion des EBLSE et de leurs gènes de résistance, à l'hôpital, dans la communauté et l'environnement et (b) de réduire la pression de sélection des

antibiotiques à l'hôpital, dans la communauté et probablement dans le monde animal.

2.3. *Acinetobacter baumannii* multi-résistant

2.3.1. Généralités sur *Acinetobacter baumannii*

Bacille à Gram négatif, non fermentant, considéré comme ubiquitaire, *A. baumannii* s'est imposé ces dernières années dans le monde comme un pathogène majeur responsable d'IAS (bactériémies, méningites, pneumopathies, infections urinaires, infections de plaies...) [79-81]. Il a la particularité d'être à l'origine de larges épidémies, notamment dans les services de soins intensifs, mais touchant parfois plusieurs services d'un même hôpital, voire plusieurs hôpitaux [82]. Auparavant, considéré comme peu virulent (opportuniste) et relativement ignoré, il a émergé en termes d'impact clinique chez des patients hospitalisés présentant le plus souvent des pathologies sous-jacentes lourdes mais aussi dans la communauté [83]. Cette augmentation des cas d'infections impliquant ce micro-organisme s'est faite parallèlement à la diffusion alarmante de souches multi-résistantes [80] voire pan-résistantes [11]. En effet, sa capacité de surexpression ou d'acquisition de déterminants de résistance en synergie avec son aptitude à survivre durant de longues périodes dans l'environnement hospitalier explique le succès de ce pathogène [81, 84]. *A. baumannii* peut être considéré comme le paradigme des bactéries multi-résistantes.

2.3.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance naturelle de *A. baumannii* à de nombreux antibiotiques est le résultat d'une faible perméabilité membranaire (peu de porines), de l'expression constitutive de systèmes d'efflux (AdeABC) [85], de la production de β -lactamases telles que les céphalosporinases chromosomiques AmpC (inactives sur la céfépime et les carbapénèmes) et OXA-51/69 (oxacilinasés, classe D de Ambler) avec une activité de carbapénémase [86]. Les systèmes d'efflux AdeABC ont été bien caractérisés

chez *A. baumannii* [87], ils assurent l'expulsion de la cellule bactérienne des aminoglycosides, du céfotaxime, des tétracyclines, de l'érythromycine, du chloramphénicol, du triméthoprim et des fluoroquinolones. En termes de résistances acquises, celles relatives aux carbapénèmes impliquent principalement les β -lactamases de type OXA (OXA-23, OXA-24 et OXA-58) et plus modestement les metallo- β -lactamases (MBL, classe B de Ambler) de types IMP, VIM et SIM [86]. Par ailleurs, cette résistance aux carbapénèmes peut aussi être liée à la perte de porines ou à la surexpression de systèmes d'efflux qui travaillent de concert avec les β -lactamases. Cela confère au micro-organisme une résistance à une grande variété d'antibiotiques. A la différence, des céphalosporinases AmpC retrouvées chez les autres bactéries à Gram négatif celle d'*A. baumannii* n'est pas inductible ; sa surexpression impliquerait l'élément génétique *ISAbal* [88]. En outre, des BLSE de la classe A d'Ambler ont été identifiées, notamment de type TEM [89], SHV [90], CTX-M [91], PER-1 [92] et VEB-1 [93, 94]. L'évaluation de leur contribution est compliquée par la difficulté de détection en laboratoire, notamment en présence d'AmpC [95]. La résistance aux quinolones est liée pour partie aux mutations des gènes *gyrA* et *parC* [96, 97]. En ce qui concerne le mécanisme de résistance à la colistine, il reste inconnu même si le rôle d'une modification du lipopolysaccharide de la membrane bactérienne a été évoqué [81]. La diminution de la sensibilité à la tigécycline, antibiotique récemment mis sur le marché est associée à la surexpression du système d'efflux AdeABC [98].

2.3.3. Epidémiologie globale

A. baumannii est responsable d'IAS sévères. Toutefois, l'évaluation de la fréquence réelle de ces infections est difficile du fait que son isolement dans les prélèvements cliniques peut refléter une colonisation plutôt qu'une infection. Néanmoins, selon le programme de surveillance de la résistance antimicrobienne SENTRY, il faisait partie des dix pathogènes les plus fréquemment isolés responsables de bactériémies dans 14 pays européens participants au programme durant la période 1997-2002 [99]. Il faut aussi noter que plusieurs études ont rapporté une saisonnalité de l'incidence des

infections à *A. baumannii* [82, 100, 101], avec des pics de cas durant l'été. La cause précise de cette saisonnalité reste inconnue.

Les facteurs de risque d'acquisition de souches multi-résistantes incluent une durée prolongée d'hospitalisation, le séjour en réanimation, la ventilation mécanique, la pression de colonisation (exercée par les patients porteurs), l'exposition préalable aux antibiotiques (carbapénèmes, fluoroquinolones, céphalosporines de 3^{ème} génération et aminoglycosides), les procédures invasives, une chirurgie récente et la sévérité de la pathologie sous-jacente [82, 102]. Le rôle de l'environnement comme réservoir secondaire de la contamination a souvent été évoqué. En effet, des études récentes ont rapporté des épidémies d'infections à *A. baumannii* multi-résistant avec une contamination environnementale retrouvée sur les rideaux, les poignets de portes, les claviers, les dispositifs médicaux (lames de laryngoscopes, humidificateurs...) [103, 104]. Ces études mettaient en relief la nécessité de porter une attention particulière sur la désinfection de l'environnement et des dispositifs médicaux pour le contrôle des épidémies à *A. baumannii* multi-résistant. A cette occasion, un ou plusieurs clones épidémiques peuvent coexister avec des souches endémiques rendant difficile la détection et la maîtrise de la transmission [105, 106]. Cette diffusion de souches multi-résistantes ne se limite pas à un service mais peut toucher plusieurs services d'un même hôpital, voire plusieurs hôpitaux, le plus souvent via le transfert de patients colonisés. De plus, cette expansion peut s'opérer à l'échelle nationale voire continentale ou mondiale. Plusieurs exemples marquants ont été observés en Europe et dans le monde ; la diffusion du "clone South-East" et des clones 1 et 2 OXA-23 dans le Sud-Est de l'Angleterre [107, 108] ; la dissémination du clone *A. baumannii* BLSE VEB-1 dans 55 établissements de santé du Nord et du Sud-Est de la France [109] et la propagation intercontinentale de souches multi-résistantes du fait du transport aérien [110]. En outre, trois clones épidémiques européens d'*A. baumannii* (clones I, II et III) ont été identifiés et diffusent dans plusieurs hôpitaux d'Europe (Belgique, Danemark, France, Espagne...) [81]. La résistance aux carbapénèmes constitue aujourd'hui un problème de plus en plus préoccupant à l'échelle de la planète (**Figure 4**) même s'il existe une grande variabilité d'une aire géographique à une autre. Selon le programme MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), basé sur une collection de souches de différentes zones géographiques la sensibilité des souches d'Australie, d'Asie et d'Amérique du Nord était plus élevée que celles

d'Europe et d'Amérique du Sud [99]. De même à l'échelle de l'Europe, la Turquie et la Grèce avaient les fréquences de résistance à l'imipénème les plus élevées suivies par l'Espagne, l'Italie, le Royaume-Uni, la Suède, l'Allemagne et la France [12].

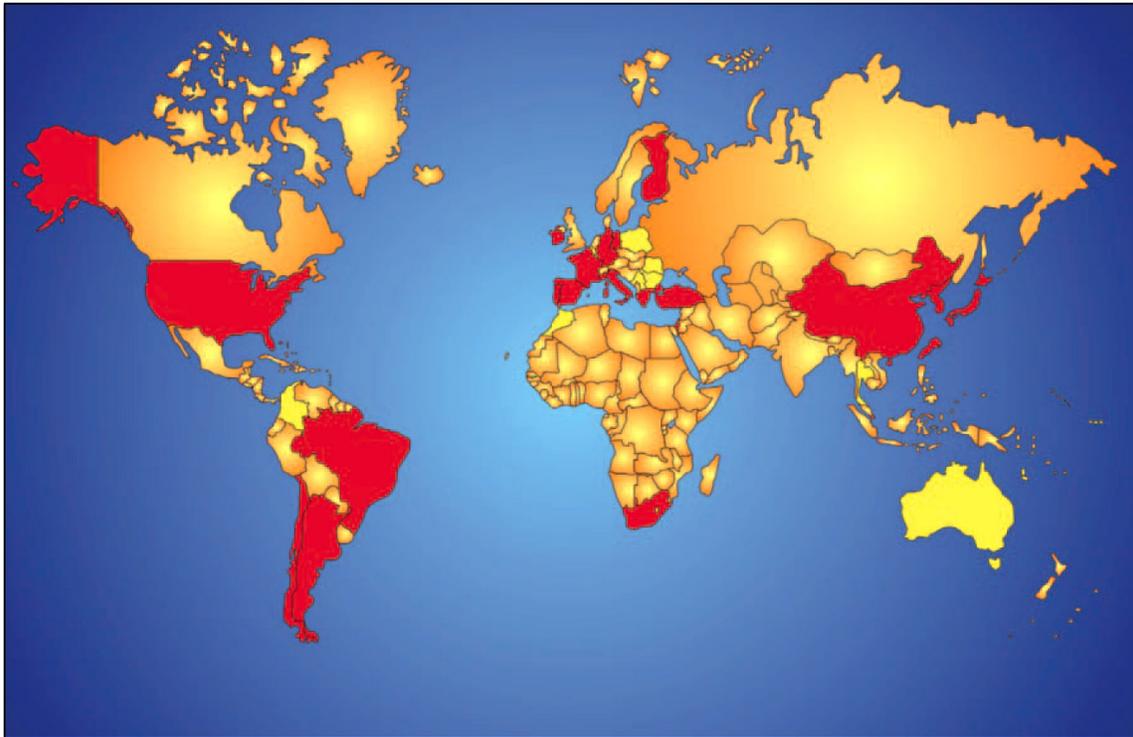


Figure 4. Pays qui ont rapporté des épidémies d'*Acinetobacter baumannii* carbapénème-résistant avant 2006 (en rouge) et à partir de 2006 (en jaune) (d'après [81])

2.4. *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant

2.4.1. Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est aujourd'hui reconnu comme une cause majeure d'IAS, notamment associées aux dispositifs invasifs, à la ventilation mécanique, à une chirurgie récente chez des patients immunodéprimés ou immunocompétents [111]. Il est responsable de 10% des IAS dans les hôpitaux en France [112]. Cette bactérie présente des propriétés qui la rendent particulièrement problématique pour les hôpitaux, notamment du fait de sa résistance intrinsèque à de nombreuses classes

d'antibiotiques et à sa capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance ainsi qu'un haut potentiel de virulence [111, 113, 114]. Bactérie ubiquitaire des milieux humides, *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste à l'origine d'une large gamme d'infections, allant d'infections cutanées (folliculites et otites externes) plutôt dans le cadre communautaire, à des infections nosocomiales plus sévères, telles que les bactériémies, les pneumopathies, les urosepsis, les infections de plaies. C'est une bactérie qui colonise les poumons des patients atteints de mucoviscidose. Les souches retrouvées chez ces patients sont souvent multi-résistantes, reflétant le fait qu'en général l'infection est difficile à éradiquer et est soumise à une exposition répétée aux antibiotiques sélectionnant des souches résistantes et hypermutables [115-117]. Une forte endémicité de cette bactérie existe dans les unités de soins intensifs, où *P. aeruginosa* évolue par bouffées épidémiques limitées sur un fond sporadique, des phénomènes épidémiques de grande ampleur pouvant s'y associer. L'importance relative de l'origine endogène par rapport à l'origine exogène (autres patients et environnement inerte) reste une question controversée. Elle varie considérablement d'un service de soins à l'autre et d'un établissement de santé à l'autre [118]. Ces différences peuvent être expliquées par des différences de l'observance par les soignants des mesures d'hygiène, de la contamination de l'environnement, des pratiques d'antibiothérapie et dans le recrutement des patients [119-123].

2.4.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

L'évolution constante de la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques a conduit à l'émergence de souches cliniques sensibles uniquement à une classe d'antibiotiques et éventuellement à des souches pan-résistantes. Ces souches résultent de l'accumulation de mécanismes de résistance multiple [124]. Le haut niveau de résistance intrinsèque aux antibiotiques repose sur la faible perméabilité membranaire, la production de la céphalosporinase inductible AmpC, et la présence de gènes codant pour différents systèmes d'efflux (MexAB-OprM et MexXY-OprM) [125]. Les résistances acquises chez *P. aeruginosa* font intervenir l'un des cinq mécanismes suivants : (i) la mutation de la cible de l'antibiotique (les gyrases, les topoisomérases ou les protéines ribosomales) [126] qui confère une résistance aux

fluoroquinolones et aux aminoglycosides, (ii) la dérégulation de la céphalosporinase AmpC [125] qui entraîne une résistance à la ticarcilline, à la piperacilline et aux céphalosporines de 3^{ème} génération, (iii) la perte de la porine OprD [125] conduisant à la résistance aux carbapénèmes, (iv) la surexpression des systèmes d'efflux [113, 127] provoquant une résistance aux β -lactamines, aux fluoroquinolones, aux tétracyclines, au chloramphénicol, à la triméthoprime et aux aminoglycosides, (v) l'expression de gènes plasmidiques d'une grande variété de β -lactamases (PSE, OXA, TEM, SHV, BLSE, MBL) et d'enzymes inactivant les aminoglycosides [124] qui conduit à une résistance aux céphalosporines anti-pyocyaniques (BLSE), aux carbapénèmes (MBL : IMP, VIM...) et aux aminoglycosides. La résistance à la colistine impliquerait des modifications structurales de la membrane externe [128].

2.4.3. Epidémiologie globale

De nombreuses études indiquent que le facteur de risque majeur de sélection de souches de multi-résistantes de *P. aeruginosa* est l'exposition préalable et prolongée aux molécules antipyocyaniques [12, 129] ; carbapénèmes [130-132] et fluoroquinolones [133-135] principalement. Les fortes contaminations environnementales identifiées lors de l'investigation d'épidémies suggèrent que la transmission croisée peut être un mécanisme important dans l'acquisition de *P. aeruginosa* multi-résistant. En fait, les différentes études utilisant des techniques de génotypage montrent que le développement de la multi-résistance peut intervenir soit par la sélection de mutants multi-résistants suite à un traitement antibiotique chez des patients porteurs de souches sensibles soit par transmission croisée avec des souches déjà résistantes [136, 137]. Dans ce cas aussi, la part relative de chacun des mécanismes varie largement d'un service à un autre. Ainsi, dans le cas par exemple, de l'identification de souches génotypiquement distinctes (pas de source commune) lors d'un phénomène épidémique, le rôle de l'usage des antibiotiques dans la diffusion de souches multi-résistantes sera plus vraisemblable. Inversement, l'isolement de souches génotypiquement identiques ou étroitement liées rendra plus vraisemblable une source commune de transmission (patients colonisés ou environnement). Au final, le contrôle de l'émergence de souches multi-résistantes doit reposer sur les deux piliers que sont l'observance des mesures d'hygiène,

notamment celles relatives aux différentes procédures invasives (ventilation mécanique, cathétérisme veineux, sondage urinaire...) et l'usage approprié des antibiotiques. Les épidémies hospitalières à *P. aeruginosa* multi-résistant sont de plus en plus souvent rapportées [138-141]. Toutefois, la prévalence de la multi-résistance parmi les souches de *P. aeruginosa* reste relativement faible en dehors des patients atteints de mucoviscidose, mais varie largement selon l'aire géographique. En effet, les données de l'EARSS (rapport 2008) [34] indiquaient que les souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* (c.-à-d., résistantes à au moins trois classes majeures d'antibiotiques), représentaient 17% des 8252 isolats provenant de 32 pays en 2008. Avec un phénotype majeur (6% des isolats) correspondant à une résistance à cinq classes d'antibiotiques (pipéracilline, ceftazidime, fluoroquinolones, aminoglycosides et carbapénèmes). Selon les auteurs, les données suggéraient l'existence d'un gradient géographique de la résistance identique à celui retrouvé chez les autres bactéries à Gram négatif (en supposant des habitudes diagnostiques comparables en Europe) ; plus faible dans le Nord-Ouest et plus élevée dans le Sud-Est. En France, dans l'inter-région Est les résultats de la surveillance (rapport 2009) indiquaient une stabilité du taux d'incidence (/1000 jours d'hospitalisation) des prélèvements à visée diagnostique positifs à *P. aeruginosa* pan-résistant (sensible à la colistine) sur la période 2007-2009 (0,018 en 2007, 0,007 en 2008 et 0,011 en 2009) [142].

3. Outils méthodologiques

3.1. Surveillance épidémiologique

La surveillance en santé publique est "le recueil systématique et l'utilisation de données épidémiologiques pour la planification, la gestion et l'évaluation de la maîtrise des maladies" (OMS, 1968). Développée initialement aux Etats-Unis, avec les CDC (Centers for Disease Control and Prevention), elle a été progressivement mise en place en France d'abord pour les maladies infectieuses, puis étendue à d'autres maladies non transmissibles (maladies liées à l'environnement, maladies chroniques...) [143, 144]. Ses objectifs recouvrent entre autres : (i) l'estimation d'un problème de santé donné, (ii) le suivi de tendances temporelles et spatiales, (iii) la détection de phénomènes émergents parmi les agents infectieux (mécanismes de résistance par exemple) et d'épidémies, (iv) l'évaluation d'une intervention ou de l'efficacité d'une procédure, (v) et enfin la suggestion d'hypothèses face à un phénomène émergent ou une modification de tendance d'une maladie. La surveillance épidémiologique repose sur un certain nombre de principes que sont la définition du cas du problème de santé (univoque, homogène dans le temps), la population cible (dénominateur pour le calcul de taux de prévalence ou d'incidence), les données à recueillir (permettre l'identification des cas et répondre aux objectifs), l'organisation de la collecte (acteurs, méthode active de préférence et circuit de l'information), et enfin l'analyse et la diffusion des résultats (fonction d'alerte du système). En ce qui concerne les infections nosocomiales, l'organisation de la surveillance en France est facilitée par l'adhésion des établissements de santé aux réseaux nationaux (surveillance des BMR...) et inter-régionaux de surveillance organisés par les C-CLIN (Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales) et l'InVS (Institut de Veille Sanitaire), coordonnée au niveau national dans le cadre du RAISIN (Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales). La mesure de l'incidence (taux d'incidence) constitue l'indicateur optimal de la surveillance des IAS dans les établissements de santé. Toutefois, la mesure de la prévalence (taux de prévalence) dans le cadre d'études de prévalence répétées périodiquement (Enquête Nationale de Prévalence des IAS) fournit des informations précieuses pour cette surveillance [145], notamment en termes d'évaluation de l'impact d'une mesure de contrôle des infections entre deux

enquêtes pour un coût largement inférieur à celui d'une étude longitudinale. Par ailleurs, si la surveillance épidémiologique a pour objectif premier la prévention, elle génère des données utiles pour la recherche épidémiologique. Notamment, en ce qui concerne l'étude de l'évolution des risques infectieux, l'identification des facteurs de risque endogènes ou exogènes, individuels ou collectifs et l'évaluation de l'impact des innovations technologiques. Enfin, dans le cadre de la surveillance, le rôle du laboratoire est devenu stratégique. En effet, il fournit une aide considérable, en particulier dans la surveillance des infections dont le diagnostic est essentiellement biologique (bactériémies), dans la détection active de cas groupés (incluant une recherche du portage occulte ; épidémies), dans le suivi de l'évolution de la résistance aux antibiotiques et la détection de mécanismes de résistance émergents avec l'apport de la biologie moléculaire (génotypage de souches et marqueurs génotypiques).

3.2. Approches éco-épidémiologiques

3.2.1. Généralités

De façon générale, l'épidémiologie est l'étude de la répartition des états de santé au sein des populations humaines, et de leurs déterminants (facteurs qui modifient la répartition, la survenue et l'évolution). Pour sa part, l'éco-épidémiologie prend en compte les éléments du milieu écologique au sens large, environnement et hommes réunis qui interviennent dans le processus épidémiologique, le conditionnent et le contrôlent.

L'approche individuelle (à l'échelle du patient), la plus communément admise par la communauté médicale et scientifique recherche les facteurs de risque individuels. En effet, elle évalue l'effet d'une exposition sur le risque individuel de développer une maladie au sein d'une population donnée. Deux types d'études analytiques sont emblématiques de cette approche : les études de cohorte (ou exposés-non exposés) et les études cas-témoins. Cette approche est la plus utilisée dans la thématique "émergence et diffusion des bactéries multi-résistantes". Le fait que les modèles et les outils d'analyse individuelle aient été développés et mis à disposition les premiers, n'est probablement pas étranger à cela. Dans ces études, le contexte est

considéré comme constant et ne rentre pas dans le cadre de l'investigation. A côté de cette approche, l'approche éco-épidémiologique classique (à l'échelle du groupe) permet d'étudier les facteurs collectifs modifiant le risque d'acquisition des bactéries multi-résistantes au niveau d'une population de patients : la pression de colonisation (autres patients porteurs), les éléments structurels et organisationnels comme la charge en soins, les pratiques d'hygiène et d'antibiothérapie. A la différence de l'approche individuelle où la mesure de l'exposition est réalisée au niveau du patient (variables individuelles), dans l'approche collective, les variables sont définies au niveau de la population de patients (unité d'hospitalisation, hôpital...). L'élaboration et l'utilisation d'indicateurs de groupe sont donc indispensables ; par exemple l'indicateur standardisé de consommation d'antibiotiques, la dose définie journalière (DDJ) qui correspond à la posologie journalière moyenne pour un adulte de 70 kg dans l'indication principale de l'antibiotique [146]. Les deux approches précédentes permettent respectivement de mettre en évidence les facteurs de risque de niveau individuel de l'acquisition des BMR et des corrélations ou des associations entre des caractéristiques au niveau de populations de patients et l'émergence des BMR. Dans les années 1990, certains auteurs ont proposé une évolution vers une éco-épidémiologie moderne qui reconnaît de façon explicite le caractère multiniveau des causes d'un phénomène épidémiologique [147-149]. Ainsi à la faveur, du développement d'outils statistiques appropriés, l'éco-épidémiologie moderne reprend les bases de l'approche collective classique en l'améliorant. Elle permet de mieux appréhender la complexité de la relation entre des expositions mesurées à différents niveaux et l'émergence des BMR. Nous exposons deux outils statistiques utilisés dans le cadre de cette thèse dont l'un prend en compte la structure hiérarchique des données de populations de patients ; l'analyse multiniveau et l'autre la temporalité ; l'analyse de séries temporelles.

3.2.2. Analyse multiniveau

3.2.2.1. Définition de l'approche multiniveau

Les approches épidémiologiques classiques, telles que les études de niveau individuel et les études écologiques sont incapables d'examiner de façon simultanée et appropriée les effets de facteurs individuels et collectifs sur le risque d'un phénomène épidémiologique (**Tableau III**). L'approche multiniveau est le plus souvent présentée comme une solution statistique au traitement de cette information qui est emboîtée en plusieurs niveaux d'observations. Elle est donc une extension des méthodes appliquées à un seul univers statistique. D'abord utilisées dans le domaines des sciences sociales et de l'éducation, les analyses multiniveaux ont émergé ces dernières années en tant qu'outil analytique utile en santé publique et en épidémiologie, notamment des maladies infectieuses [150-153]. Cette approche permet la prise en compte de la structure hiérarchique de l'information : un patient dans une unité d'hospitalisation, une unité d'hospitalisation dans un hôpital, un hôpital dans un réseau régional de soins. Chacun de ces niveaux sont décrits par des caractéristiques propres (variables), mais qui se rapportent à des unités plus rares au fur et à mesure que l'on s'élève dans la hiérarchie. Les modèles multiniveaux ou hiérarchiques ou mixtes introduisent plusieurs sources de variation aléatoire ; l'échantillon de patients par exemple est pris dans un échantillon d'unités d'hospitalisation, elles-mêmes dans un échantillon d'hôpitaux. Les structures hiérarchiques de l'information sont nombreuses (**figure 5**) et les regroupements de nature spatiale, organisationnelle, sociale et temporelle. Ne pas prendre en compte cette structure hiérarchique des données et donc de la possible corrélation (non indépendance) des observations expose à des erreurs statistiques (sous estimation des erreur-types des coefficients des variables explicatives), mais aussi d'interprétation. En effet, cette corrélation des observations au sein d'un groupe est une violation de l'hypothèse fondamentale de la modélisation uni-niveau classique. Les erreurs d'interprétation sont de deux types : (i) l'erreur écologique qui consiste à interpréter les différences entre les groupes comme des différences existant entre les individus (ii) et l'erreur atomistique qui est symétrique de la proposition précédente ; traiter les observations au niveau individuel ne permet pas d'étendre les conclusions au niveau du groupe.

Tableau III. Types d'études épidémiologiques en fonction des échelles (d'après Diez-Roux et Aiello [151])

Variables d'exposition définies au niveau	Paramètre de santé défini au niveau	Etude
Individuel	Individuel	Individuelle
Collectif	Collectif	Ecologique
Individuel et collectif	Individuel	Multiniveau

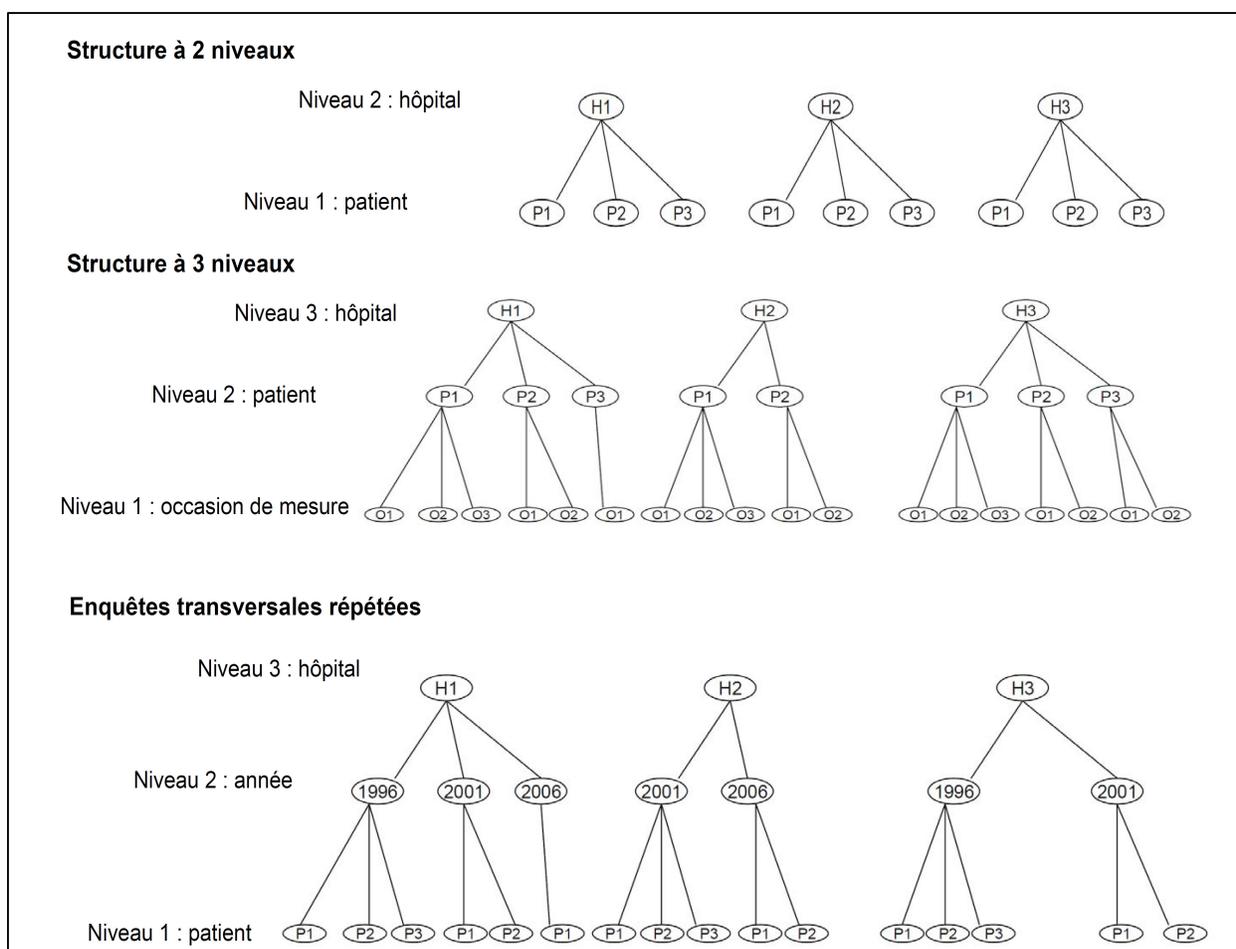


Figure 5. Exemples de structures de données multiniveaux.

Finalement, l'analyse multiniveau apporte des éléments statistiques nouveaux sur l'importance respective du niveau individuel et du niveau contextuel.

3.2.2.2. Les variables dans l'analyse multiniveau

La structure hiérarchique de l'information correspond à deux types de variables, les variables individuelles et les variables écologiques. Les premières sont mesurées au niveau de chaque individu et permettent d'identifier les facteurs de risque individuels. Les secondes permettent d'identifier les facteurs de risque collectifs. Ces variables écologiques ou collectives sont de plusieurs types (**Tableau IV**) [154], variables agrégées, environnementales et globales. Les variables agrégées (contextuelles ou analytiques) sont déduites des caractéristiques des individus du groupe ou plus généralement des unités du niveau inférieur (moyennes, écart-types, proportions de modalités qualitatives...). Les variables de contagion ressemblent aux variables agrégées par leur construction qui correspond à l'agrégation de variables individuelles au niveau du groupe. Mais à la différence des variables agrégées, la variable de contagion influence en retour la variable individuelle qui a servi à sa construction (la prévalence d'une maladie infectieuse construite à partir du nombre de patients infectés rapporté à la population totale, elle affecte en retour le risque pour un individu d'être contaminé par l'agent infectieux). Les variables environnementales caractérisent les propriétés physiques de l'environnement (données climatiques, pollution...). Les variables globales ou intégrales décrivent des caractéristiques du groupe qui sont indépendantes des unités qui le composent (statut privé ou public d'un hôpital...). Il existe plusieurs types d'effets écologiques (variable écologique, X_E) (**Figure 6**) : (i) une modification de l'effet d'un facteur individuel (variable individuelle, x) sur le paramètre de santé étudié (variable réponse, y), (ii) un effet direct de X_E sur y , (iii) et un effet indirect.

Tableau IV. Classification des variables écologiques (d'après Blakely et Woodward [154])

Type de variable	Description	Exemples
Agrégée Contextuelle Analytique	Agrégation de caractéristiques mesurées à l'échelon individuel. Souvent une tendance centrale (moyenne, médiane), mais peut être l'expression de la variabilité des valeurs (écart-type)	Revenu moyen Classe sociale médiane Proportion de fumeurs Inégalité des revenus
Contagion	Agrégation du paramètre de santé étudié à l'échelon individuel (et non l'exposition), qui en retour influence la probabilité individuelle des sujets non encore "infectés"	Prévalence de pathologies infectieuses Taux de suicide
Environnementale	Caractéristiques physiques des lieux, avec une variabilité individuelle le plus souvent non mesurée	Pollution Heures d'ensoleillement Latitude, longitude Climat
Globale Intégrale	Correspond aux attributs du groupe, de l'endroit, et ne peut pas être réduit au niveau individuel. Fixée pour l'ensemble des membres du groupe	Législation Organisation sociale

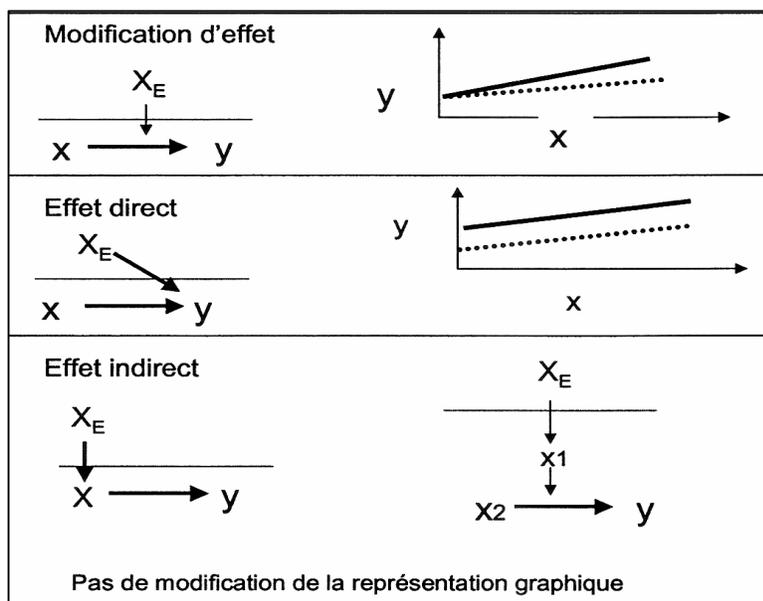


Figure 6. Effets écologiques

3.2.2.3. Modélisation multiniveau

L'approche multiniveau permet de construire différents modèles (linéaire, logistique, de Poisson...) plus ou moins complexes suivant la structure des données (hiérarchique ou non) et la nature de la variable réponse (continue, binaire...). Goldstein *et al.* décrivent plusieurs types d'analyses multiniveaux [155, 156] : études de populations avec structure hiérarchique (patient au sein d'un hôpital), données de mesures répétées (épisodes de mesure d'un paramètre biologique chez un patient au sein d'un hôpital)... La corrélation des observations (niveau individuel) au sein d'un groupe constitue une nuisance pour la validité des tests statistiques classiques, alors que dans l'analyse multiniveau, cette structure hiérarchique sera prise en compte et modélisée. L'emploi de modèles multiniveaux permet de partager la variabilité totale en variabilité inter-individuelle et en variabilité inter-groupe.

Soit Y (variable réponse) la mesure d'un paramètre biologique, X une variable explicative de niveau 1 (patient) et Z une variable explicative de niveau 2 (hôpital)

- Modèle de régression classique : un seul hôpital

L'effet de la variable X sur Y s'écrit :

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i$$

Avec y_i et x_i les valeurs respectives de Y et X chez le patient i . β_0 la constante, β_1 le coefficient de X et e_i l'erreur résiduel du modèle pour le patient i . Ce modèle est représenté graphiquement dans la **figure 7**.

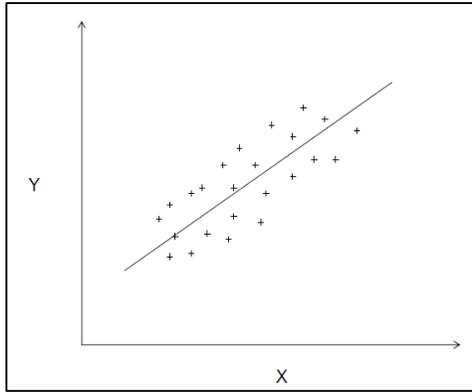


Figure 7. Modèle linéaire classique

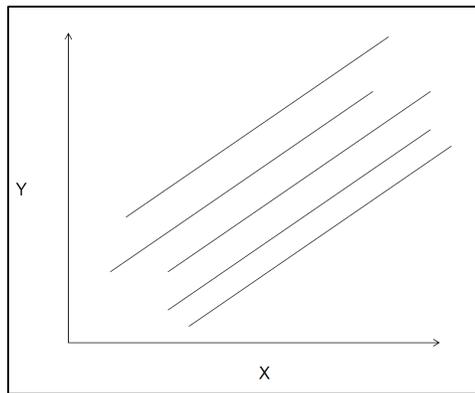


Figure 8. Modèle multiniveau à coefficient fixe

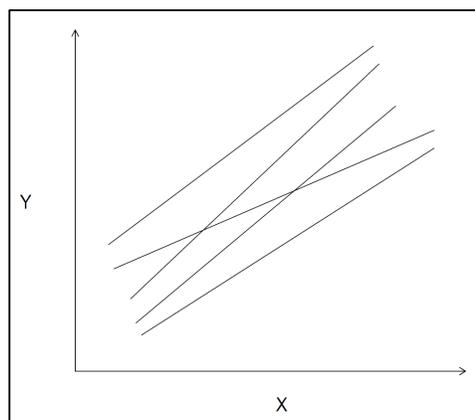


Figure 9. Modèle multiniveau à coefficient aléatoire

- Modèle multiniveau à intercept aléatoire et coefficient fixe : plusieurs hôpitaux, relation simple.

Cette approche prend en compte la structure hiérarchique des données (patient au sein d'un hôpital). L'équation précédente devient en analyse multiniveau

$$y_{ij} = \beta_{0j} + \beta_1 x_{ij} + e_{ij}$$

$$\beta_{0j} = \beta_0 + u_{0j}$$

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_{ij} + e_{ij} + u_{0j}$$

Avec y_{ij} et x_{ij} les valeurs respectives de Y et X chez le patient i issu de l'hôpital j. β_{0j} intercept (constante) qui varie d'un hôpital à un autre. Elle peut être décomposée en part fixe β_0 et part aléatoire u_{0j} . Ce modèle est représenté graphiquement dans la **figure 8** où pour chaque hôpital, la pente est identique (coefficient fixe) mais le niveau de base différent.

- Modèle multiniveau à intercept et à coefficients aléatoires : plusieurs hôpitaux, relation complexe.

Finalement, il est possible de rajouter une variation du coefficient de la variable X d'un hôpital à un autre.

$$y_{ij} = \beta_{0j} + \beta_{1j} x_{ij} + e_{ij}$$

$$\beta_{0j} = \beta_0 + u_{0j}$$

$$\beta_{1j} = \beta_1 + u_{1j}$$

La notation du model multiniveau devient alors :

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 x_{ij} + (u_{0j} + u_{1j} x_{ij} + e_{ij})$$

Ce qui est représenté par la **figure 9**.

Un modèle incluant une variable de niveau hôpital Z peut s'écrire :

$$Y_{ij} = \gamma_{00} + \gamma_{01}Z_j + \gamma_{10}X_{ij} + \gamma_{11}Z_jX_{ij} + (u_{0j} + u_{1j}X_{ij} + \epsilon_{ij})$$

Avec :

y_{ij} la variable réponse du patient i issu de l'hôpital j , x_{ij} une variable explicative de niveau 1 (patient), γ_{00} la constante moyenne dans l'échantillon, Z_j une variable de niveau 2 (hôpital), le terme Z_jx_{ij} l'interaction entre la variable de niveau 1 et celle de niveau 2 (interaction inter-niveau).

La stratégie de modélisation usuelle suggérée par Hox (1995) [157] (complexification croissante du modèle) comprend : (i) modèle vide (n'inclut que l'intercept aléatoire, sert de référence) ; (ii) modèle individuel (intercept aléatoire + variables du niveau le plus bas) ; (iii) modèle à coefficients aléatoires (variation de l'effet des variables individuelles au niveau supérieur) ; (iv) modèle final (ajout de variables contextuelles ou d'interactions inter-niveaux).

3.2.3. Analyse des séries temporelles

3.2.3.1. Définition d'une série temporelle

Une série temporelle peut être définie comme une séquence d'observations d'un paramètre numérique mesuré à des intervalles de temps égaux. Il existe deux types de séries temporelles ; les séries temporelles continues (mesure en continue d'un signal) et les séries temporelles discrètes (mesure périodique d'un signal). Les séries temporelles continues peuvent être transformées en séries discrètes par découpage du signal en période de temps très courte. Les séries temporelles ainsi que les outils statistiques qui en découlent ont été développés d'abord dans le domaine de l'économétrie mais sont aujourd'hui utilisées dans un grand nombre de disciplines : climatologie, sciences sociales, médecine...

L'analyse d'une série temporelle peut consister : (i) à identifier les phénomènes élémentaires (composantes) qui déterminent la série et traduisent l'intervention de

facteurs explicatifs sous jacents ; (ii) à prévoir l'évolution ultérieure de la série à terme (horizon) donné ; (iii) à étudier la relation statistique entre une série temporelle décrivant un problème de santé, et une ou plusieurs autres séries temporelles caractérisant l'évolution concomitante de facteurs explicatifs possibles. Mathématiquement, une série temporelle est définie par : X une variable définie à des temps t ($X_t, t = 0, \pm 1 \dots$).

3.2.3.2. L'auto-corrélation temporelle

La caractéristique essentielle d'une série temporelle est l'existence d'une liaison statistique (corrélation) plus ou moins forte entre les valeurs successives de la série : c'est l'auto-corrélation. Une hypothèse fondamentale des outils statistiques classiques (régression) est celle de l'indépendance des observations. Si cette indépendance n'est pas vérifiée, les résultats statistiques peuvent être biaisés. L'analyse de séries temporelles permet non seulement de s'affranchir de cette hypothèse mais aussi de mesurer cette auto-corrélation temporelle.

3.2.3.3. La stationnarité

L'utilisation des outils d'analyse des séries temporelles exige que l'on travaille sur une série stationnaire, c.-à-d. que la moyenne de la série ainsi que sa variance sont constantes :

- l'espérance mathématique $E(X)$ de la variable X , est indépendante de la période d'observation,
 $\mu_x(t) = E(X_t)$ avec $\mu_x(t)$ la moyenne des réalisations de la variable X à l'instant t ;
- la covariance entre deux observations est indépendante de la période d'observation et ne dépend que de l'intervalle entre les deux observations,
 $\gamma_{(t_1, t_2)} = \text{Cov}(t_1, t_2)$
 $\gamma_{(t_1, t_2)} = \gamma_{(t_1+k, t_2+k)} = \gamma_k$; k le retard entre les deux périodes t_1 et t_2 .

Ainsi, que l'on prenne la série X_t ou la série décalée X_{t+k} , la moyenne doit être identique et la covariance entre un point et un autre distant de k intervalles ne dépend que de ce retard k (**Figure 10**). Très souvent, les séries temporelles ne respectent pas cette propriété du fait de perturbations telles que la tendance et la saisonnalité. La tendance se traduit par une modification de la moyenne dans le temps (**Figure 11**), alors que la saisonnalité correspond à un cycle régulier dans la série (**Figure 12**). La meilleure méthode pour éliminer toute tendance est de différencier, c.-à-d. de remplacer la série originale par la série des différences adjacentes. La correction d'une non stationnarité en termes de variance peut être réalisée par des transformations de type logarithmique (si la variance croît dans le temps) ou à l'inverse exponentielle.

En 1976, Box et Jenkins ont développé une méthode pour modéliser les séries temporelles : la méthode ARIMA (Autoregressive, Integrated, Moving Average). La composante autorégressive (AR) désignée par p représente les effets persistants des observations précédentes ; la composante intégrative (I) notée d représente les tendances dont la saisonnalité ; la composante moyenne mobile (MA) notée q représente les effets persistants de chocs aléatoires (ou erreurs).

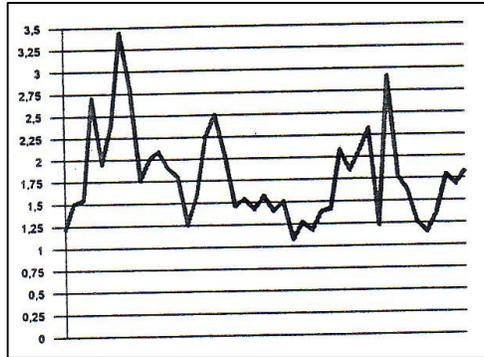


Figure 10. Série stationnaire

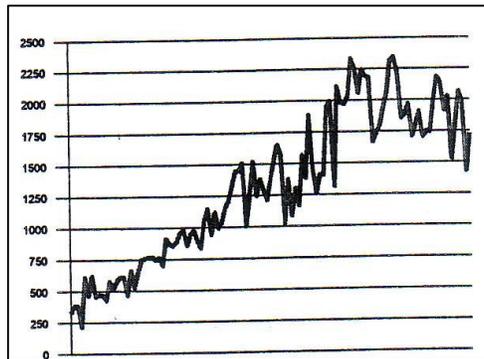


Figure 11. Série non stationnaire (tendance croissante)

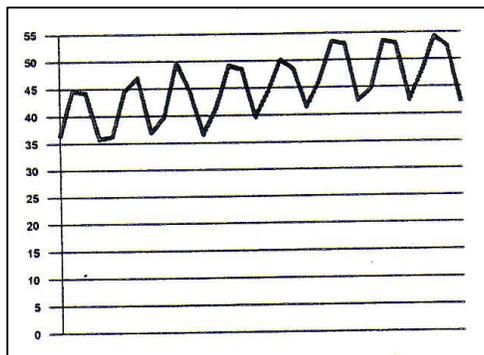


Figure 12. Série non stationnaire (saisonnalité)

3.2.3.4. L'analyse univariée

Elle correspond à la détermination des paramètres AR, I et MA par l'examen des fonctions d'auto-corrélation (ACF) et d'auto-corrélation partielle (PACF). La modélisation d'une série temporelle se décompose en plusieurs étapes.

- Le calcul de l'ACF et de la PACF de la série.
- L'examen graphique des deux fonctions et l'identification des composantes AR et MA du modèle ;
 - o (i) l'ACF présente une décroissance lente pour des décalages élevés pour atteindre zéro, la PACF chute brusquement : composante autorégressive, l'ACF décroît régulièrement vers zéro, la PACF présente deux pics aux décalages "lags" 2 et 3, il s'agit d'un modèle AR(2,3) I(0) MA(0) **(Figure 13)** ;
 - o (ii) la PACF présente une décroissance lente pour atteindre zéro, l'ACF chute brusquement : composante moyenne mobile, la PACF décroît graduellement vers zéro et l'ACF présente deux pics aux décalages 1 et 2, il s'agit d'un modèle AR(0) I(0) MA (1,2) **(Figure 14)** ;
 - o (iii) si l'ACF présente une décroissance sans jamais atteindre zéro **(Figure 15)**, il faut différencier la série : composante intégrative, différenciation à des décalages différents, la série différenciée au décalage 1 présente ensuite une PACF avec des pics aux décalages 2 et 3, il s'agit d'un modèle AR(2,3) I(1) MA (0) **(Figure 16)** ;
 - o (iv) l'ACF et la PACF peuvent combiner les différents profils ci-dessus correspondant à des modèles plus complexes ;
- L'estimation d'un modèle ; les résidus (bruit blanc) doivent être non significatifs, seuls les paramètres significatifs sont retenus.

Il existe un modèle ARIMA permettant de prendre en compte la saisonnalité en différenciant la série par le délai entre deux cycles : variations saisonnières annuelles, la série est différenciée au décalage 12 mois. Ce modèle est appelé SARIMA (Seasonal Autoregressive, Integrated, Moving Average).

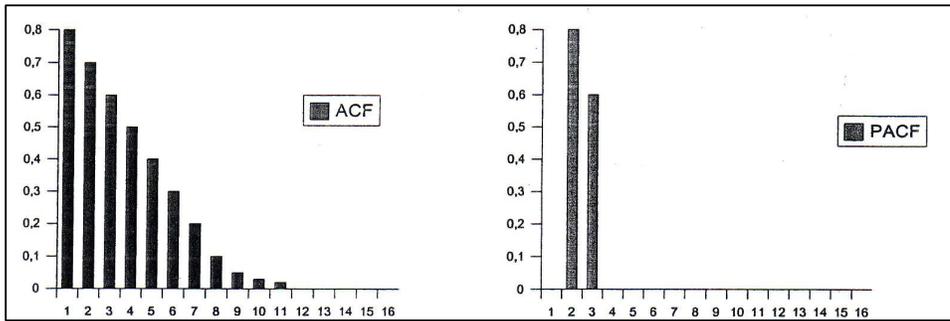


Figure 13. Modèle AR(2,3) I(0) MA(0)

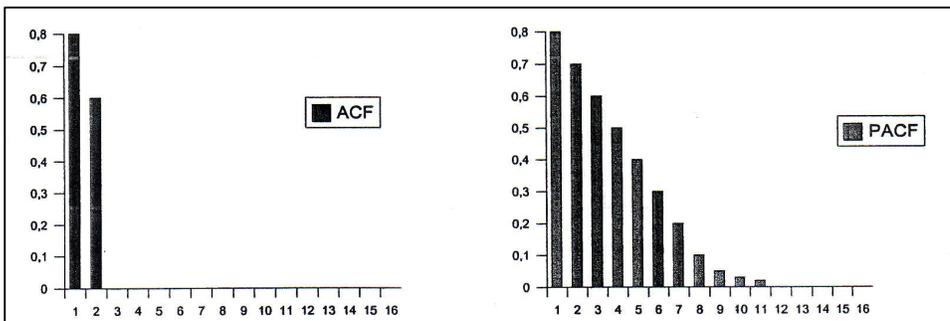


Figure 14. Modèle AR(0) I(0) MA(1,2)

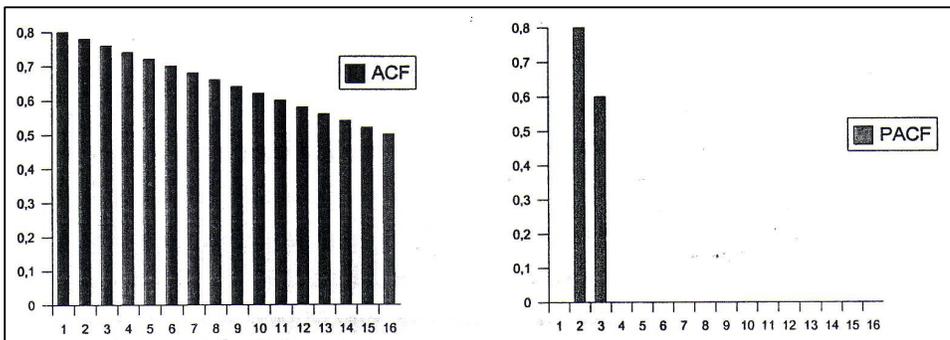


Figure 15. Modèle non différencié

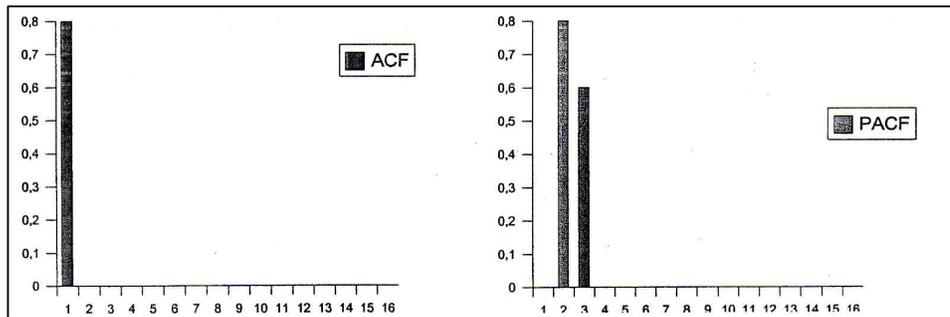


Figure 16. Modèle après différenciation AR(2,3) I(1) MA(0)

3.2.3.5. L'analyse multivariée

Cette analyse permet d'expliquer une série temporelle par d'autres séries temporelles. Elle peut être rapprochée d'outils statistiques classiques dans lesquels une variable Y est expliquée par des variables X. Cette analyse est réalisée par la détermination de la fonction de transfert qui permet de calculer les valeurs de la série expliquée à partir des valeurs des séries explicatives. Plusieurs méthodes existent et sont exposées ci-dessous.

- La méthode de Box-Jenkins
 - o (1) Identification d'un modèle ARIMA pour la série explicative.
 - o (2) Filtre de la série expliquée avec le modèle (1).
 - o (3) Fonction de corrélation croisée entre les résidus de (1) et (2).
 - o (4) Identification d'une fonction de transfert grâce aux décalages identifiés en (3).
 - o (5) Modélisation ARIMA de la série de résidus de la fonction de transfert.
 - o (6) Ajout des composants ARIMA détectés dans les résidus (5) à la fonction de transfert (4).
 - o (7) Répétition des étapes (4) et (5).
 - o (8) Fonction de corrélation croisée entre les résidus (5) et les résidus (1) pour détecter d'autres décalages.
 - o (9) Estimation des paramètres du modèle identifié.

- La méthode de Hauge est pratiquement identique à la précédente à l'exception de l'étape (2) ; la série expliquée n'est pas filtrée mais on modélise directement cette série suivant un modèle ARIMA.

- La méthode de Pankratz [158] (fonction de transfert linéaire)
 - o (1) Estimation d'un modèle ARIMA de la série expliquée avec un nombre de paramètres correspondant à différents décalages de la série explicative, et une approximation du composant stochastique de la série expliquée par un paramètre autorégressif d'ordre 1.

- (2) Identification et estimation d'un modèle pour la série dénommée "perturbation" (différence entre la série originale et la série modélisée (1)) et pour les résidus.
- (3) A partir de la série "perturbation" et de la série des résidus (2), incorporation des paramètres antérieurs de la série expliquée et éliminations des termes non significatifs de la série explicative.
- (4) Estimation du modèle (3).
- (5) Répétition des différentes étapes si le modèle résultant n'est pas satisfaisant.

3.3. Epidémiologie moléculaire

L'épidémiologie des IAS, et notamment celles impliquant des BMR a considérablement bénéficié de l'apport de la biologie moléculaire [159] pour le typage des micro-organismes en cause (marqueurs épidémiologiques). En effet, si l'antibiotypie (marqueur phénotypique) reste la méthode de base pour la surveillance de la dissémination des BMR, les méthodes (marqueurs) génotypiques permettent de dépasser les limites de cette technique (pouvoir discriminant faible, modification possible des profils de résistance aux antibiotiques au cours du temps, au gré de l'évolution de la pression de sélection). Nous présentons dans la suite de cet exposé trois méthodes génotypiques utilisées dans le cadre de cette thèse.

3.3.1. Techniques utilisant la PCR

Mise au point par Kary Mullis en 1983 [160, 161], la PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier spécifiquement une séquence cible (**Figure 17**). Le cycle élémentaire comprend une phase de dénaturation de l'ADN cible (90 à 95 °C), une phase d'hybridation de deux amorces de polarité opposée (40 à 75 °C) sur les deux brins d'ADN, puis une phase d'élongation (70 à 75 °C) par une ADN-polymerase thermorésistante (*Taq* polymérase) grâce à un thermocycleur programmable permettant d'effectuer de nombreux cycles successifs (20 à 40 cycles) et d'obtenir une quantité d'ADN amplifié (amplicon) détectable [162]. Une étape pré-PCR qui correspond à l'extraction d'ADN après la lyse bactérienne (choc thermique, méthodes enzymatiques...) et une étape post-PCR (détection des produits PCR sur un gel d'agarose) complète la présentation de cette technique. Par ailleurs, on assiste au développement fulgurant de la PCR en temps réel qui prend une place considérable en microbiologie médicale et environnementale [163] (détection rapide et quantification d'agents pathogènes). Elle repose sur la détection et la quantification d'une molécule "reporter" fluorescente dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Finalement, la PCR permet la détection de déterminants de résistance ou de virulence. Par exemple, la détection du gène *mecA*, du type *SCCmec* [164], des gènes de la PVL et de la TSST-1 chez le SARM [165].

L'utilisation de la PCR dans le typage bactérien fait intervenir des techniques telles que l'AP-PCR (Arbitrarily-Primed PCR) ou RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ou encore AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism) [166-168].

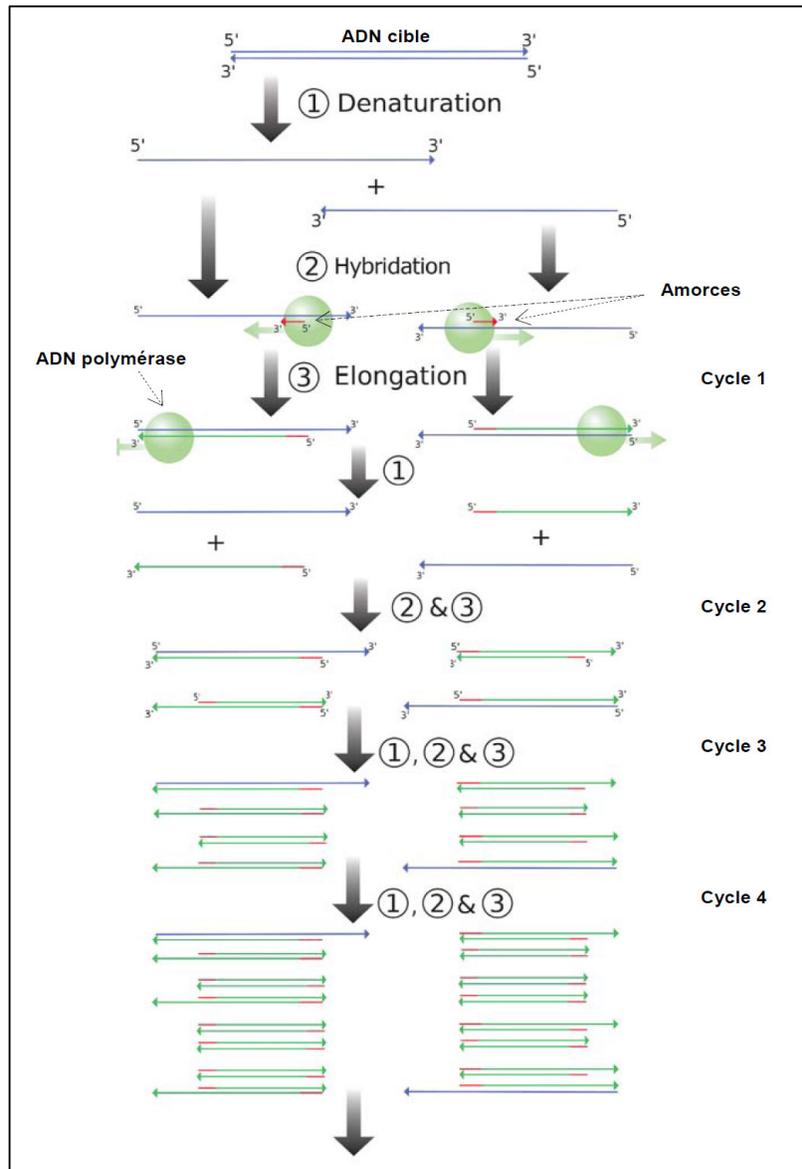


Figure 17. Amplification d'une séquence par PCR

3.3.2. Analyse de macrorestriction de l'ADN total par l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis)

Elle consiste à couper l'ADN génomique extrait de microorganismes préalablement inclus dans une matrice d'agarose (évite les cassures mécaniques) par une enzyme de restriction (endonucléase) possédant un faible nombre de sites de restriction. La PFGE donne des profils de 10 à 30 bandes (fragments) de taille variant de 10 à 800 kilobases (kb). La séparation de ces fragments est réalisée par une électrophorèse utilisant des champs électriques de direction variable, seuls capables de séparer des fragments de tailles supérieures à 25 kb (**Figure 18**). La PFGE reste à l'heure actuelle l'une des techniques de typage les plus discriminantes. La comparaison des profils de macrorestriction repose sur le nombre et la taille des fragments d'ADN. Des critères d'interprétation consensuels ont été proposés [169], tenant compte de mutations aléatoires (**Tableau V**). La comparabilité entre les gels peut être assurée par l'introduction, comme marqueur de taille, d'ADN de la souche de référence *S. aureus* NCTC 8325, produisant avec *Sma*I 15 fragments chromosomiques de tailles connues. Après la digitalisation de l'image du gel, l'utilisation de logiciel permet d'établir une matrice de similitude de l'ADN, basée sur le calcul du coefficient de Dice (comparaison des profils deux à deux, nombre de fragments communs multiplié par deux et divisé par le nombre total de fragments dans les deux profils). Un dendrogramme est ensuite construit en utilisant, comme algorithme de hiérarchisation, la méthode de groupement par la distance moyenne ou UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages).

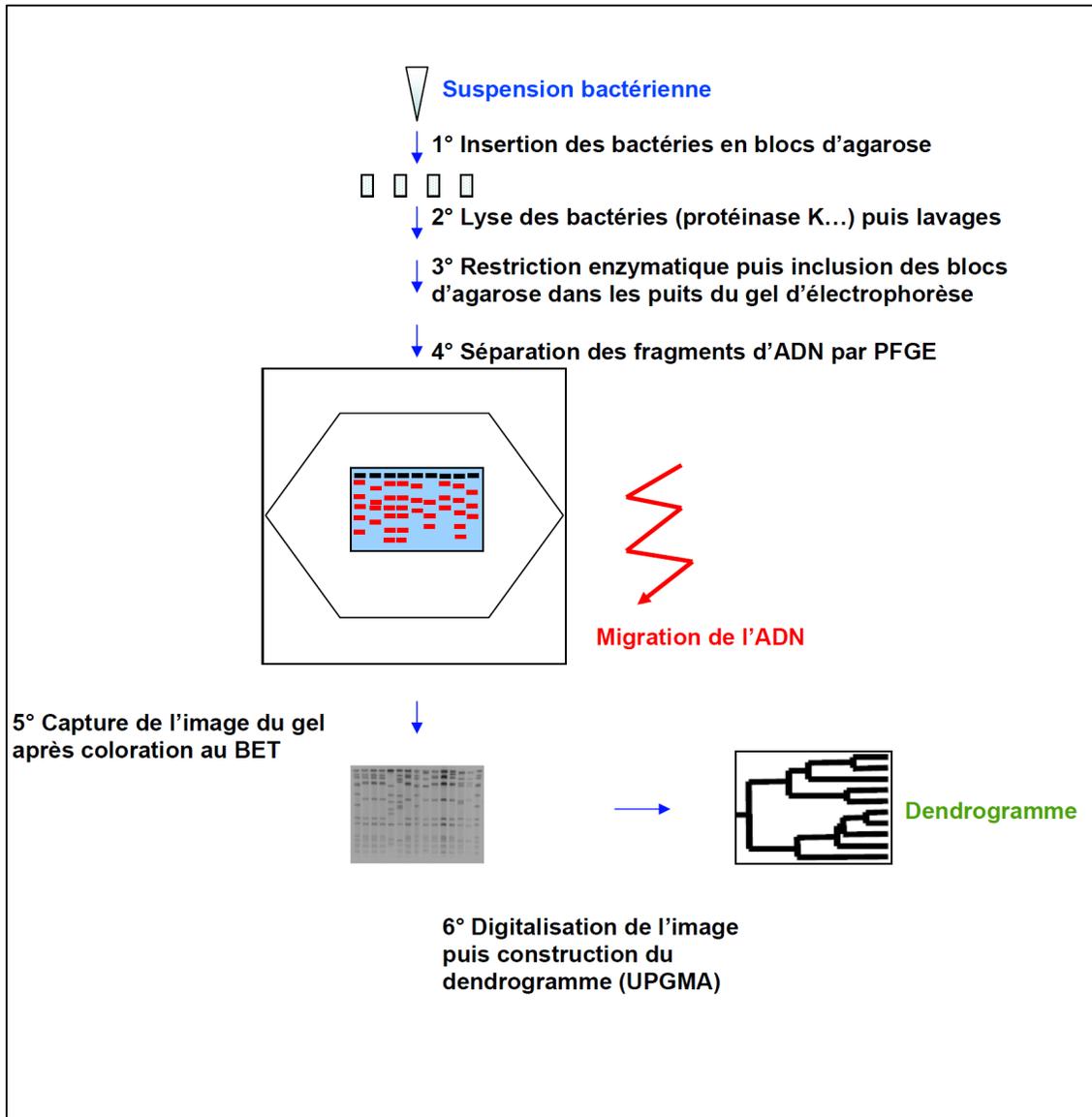


Figure 18. Principe de l'analyse PFGE

Tableau V. Critères d'interprétation des profils de macrorestriction génomique générés par PFGE (d'après Tenover *et al.* [169])

Catégorie	Nombre d'évènements génétiques	Nombre de fragments différents	Interprétation épidémiologique
Identiques	0	0	Les isolats font partie de l'épidémie
Etroitement liés	1	2-3	Les isolats font probablement partie de l'épidémie
Probablement liés	2	4-6	Les isolats sont peut-être liés à l'épidémie
Différents	≥ 3	≥ 7	Les isolats ne font pas partie de l'épidémie

3.3.3. Typage par séquençage multilocus (MLST, MultiLocus Sequence Typing)

La subjectivité d'interprétation des profils, l'impossibilité de quantifier les différences génétiques mises en évidence et la difficulté à comparer rapidement les images obtenues dans différents laboratoires sont les principales limites des méthodes présentées précédemment. Le MLST n'a pas ces inconvénients. Cette technique est basée sur l'analyse de la séquence de gènes de ménage "housekeeping genes" obtenue après PCR (**Figure 19**), le principe étant que la combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée [170]. Ces gènes codent pour des enzymes du métabolisme intermédiaire. L'analyse d'une séquence interne d'environ 500 paires de bases (pb), de sept gènes a été adoptée par consensus et toute mutation relevée dans la séquence d'un de ces gènes définit un nouvel allèle. Chaque allèle est identifié par un chiffre, chaque combinaison d'allèles pour les sept gènes séquencés définit un profil allélique [171]. Les séquences des gènes des souches typées ainsi que leurs caractéristiques (origine de la souche, nature du prélèvement clinique, phénotype de résistance...) sont déposées sur le site internet (<http://www.mlst.net>). Le profil allélique d'une souche donnée peut ensuite être comparé à celui de toutes les souches déjà déposées sur le site spécifique à l'espèce étudiée. Il est aussi possible de les comparer à l'aide de dendrogrammes (détermination de distances génétiques) et de déterminer les filiations entre les isolats (complexes clonaux). L'analyse MLST est idéale pour les études d'épidémiologie globale [172]. En effet, l'accumulation rapide des variations détectées par l'analyse PFGE est utile pour des études épidémiologiques à court terme comme l'investigation d'épidémies ou l'étude de population clonale. En revanche, l'épidémiologie globale requiert une méthode permettant de distinguer un grand nombre de génotypes en examinant des variations génétiques accumulées lentement [172, 173]. Des variantes du MLST qui nécessitent le séquençage d'un unique gène sont actuellement en développement avec le SLST (Single Locus Séquence Typing) qui est pratiqué sur des gènes possédant un polymorphisme lié à l'existence de courts motifs répétitifs variables en nombre et en séquence tel que celui codant pour la protéine A de *S. aureus* (*spa* typing) [159].

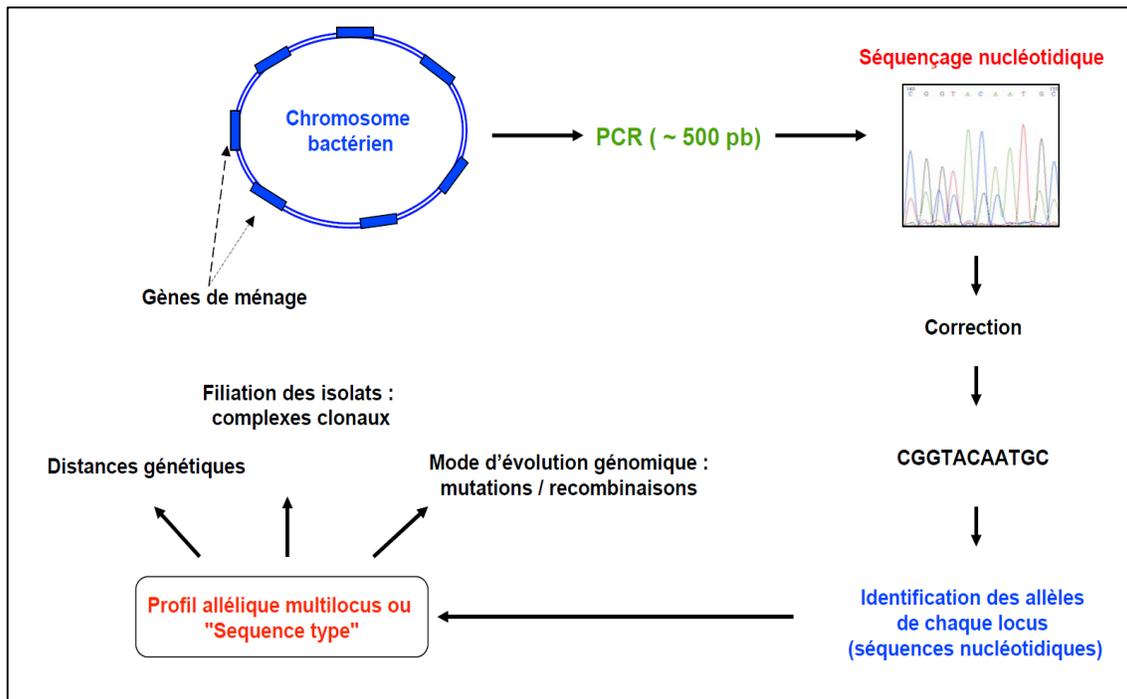


Figure 19. Principe de l'analyse MLST

2^{ème} PARTIE : TRAVAUX

Cette thèse avait pour but de caractériser des phénomènes émergents de multi-résistance à l'échelle d'un hôpital universitaire régional ou de l'inter-région Est.

- Le CHU de Besançon est un établissement public de santé d'environ 1200 lits, réalisant 50 000 admissions chaque année pour un total d'environ 350 000 journées d'hospitalisation. Il est réparti sur deux sites ; l'hôpital Saint-Jacques (site historique) et l'hôpital Jean Minjoz. Il est situé à Besançon, capital de la région Franche-Comté.
- L'inter-région Est désigne les cinq régions de l'Est de la France (Alsace, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche-Comté et Lorraine) qui compte au total 8,5 millions d'habitants soit environ 14% de la population française.

Dans le cadre de cette thèse, nous présentons dans les pages qui suivent une série de travaux qui abordent différents aspects de la thématique BMR émergentes : la détection, l'évaluation de mesures de contrôle et l'épidémiologie clinique et moléculaire.

1. Etude 1 – Intérêt du profil de résistance aux antibiotiques dans la détection de souches de SARM productrices de toxines PVL ou TSST-1.

1.1. Présentation de l'étude

Au cours de ces dernières années, de nombreuses publications ont fait état de l'émergence dans le cadre hospitalier de souches de SARM-C productrices de toxines PVL ou TSST-1. Certains auteurs ont avancé l'idée de l'utilisation des profils de résistance aux antibiotiques pour la détection de ses souches.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la pertinence de cette approche.

Une étude rétrospective monocentrique couvrant la période 2004-2007 a été menée au CHU de Besançon. La constitution de notre échantillon s'est faite à partir des souches de SARM isolées de prélèvements à visée diagnostique (une souche par patient) au cours de cette période : (i) inclusion de toutes les souches de phénotype fluoroquinolone-sensible (FQS) ; (ii) et pour chacune d'entre elles, deux souches de phénotype fluoroquinolone-résistant (FQR), sélectionnées de façon aléatoire ont été incluses. Les isolats inclus ont été caractérisés en termes de profil de résistance aux antibiotiques, de profil PCR (*mecA*, *tst*, gènes de la PVL), de profils PFGE (*Sma*I) et MLST. Des données cliniques et démographiques des patients ont été recueillies par la revue des dossiers médicaux. L'évaluation de la valeur des profils de résistance aux antibiotiques comme marqueurs de souches SARM PVL+ et/ou TSST-1+ s'est faite par la détermination des indicateurs de performance de différentes combinaisons de résistances antibiotiques.

1.2. Conclusion

Pour les souches SARM PVL+, le profil typique (FQS, non sensible à l'acide fusidique, gentamicine-sensible, kanamycine-résistant et tobramycine-sensible) avait une sensibilité (Se), une valeur prédictive positive (VPP) et un rapport de vraisemblance positif (RVP) égales à 77,8%, 100% et l'infini respectivement. Pour les souches SARM TSST-1+, le profil d'antibio-résistance FQS et non sensible à l'acide

fusidique donnait des valeurs d'indicateurs égales à 100%, 72,4% et 15,8 respectivement. La prise en compte des aminoglycosides dans la règle phénotypique donnait pour le profil majeur (FQS, non sensible à l'acide fusidique, gentamicine-sensible, kanamycine-résistant et tobramycine-résistant) les résultats suivant : 61,9%, 92,9% et 78, respectivement.

Les résultats de cette étude nous permettent d'estimer respectivement à 1% (9/962) et 2% (21/962) les proportions de souches SARM PVL+ et SARM TSST-1+ parmi l'ensemble des SARM isolées au CHU de Besançon entre 2004 et 2007. Cette prévalence des SARM PVL+ au sein des SARM semble stable par rapport aux résultats d'une précédente étude incluant 12 hôpitaux français dont le CHU de Besançon. Les souches SARM PVL+ appartenaient au clone européen ST80 et les souches SARM TSST-1+ au clone Géraldine ST5. Par ailleurs, notre étude confirme que les seuls critères épidémiologiques (absence d'exposition à l'environnement des soins) sur lesquels repose la définition du CDC des SARM-C sont aujourd'hui insuffisants. Le caractère monocentrique de l'étude limite la généralisation des résultats obtenus. Toutefois, de précédentes études suggèrent que ces résultats peuvent être étendus à la situation française et européenne du SARM [44, 48, 174-176].

Finalement, cette étude démontre l'utilité et la pertinence de règles phénotypiques basées sur le profil de résistance aux antibiotiques dans la détection de SARM PVL+ ou TSST-1+. L'identification de ces souches est essentielle pour la mise en œuvre de mesures d'hygiène appropriées pour limiter leur diffusion.

1.3. Texte de l'article

GBAGUIDI-HAORE H, THOUVEREZ M, COUETDIC G, CHOLLEY P, TALON D, BERTRAND X. Usefulness of antimicrobial resistance pattern for detecting PVL- or TSST-1-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a French university hospital. *J Med Microbiol*, 2009, 58, p. 1337-1340.

Usefulness of antimicrobial resistance pattern for detecting PVL- or TSST-1-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a French university hospital

Houssein Gbaguidi-Haore,^{1,2} Michelle Thouverez,^{1,2} Gérard Couetdic,³ Pascal Cholley,^{1,2} Daniel Talon^{1,2} and Xavier Bertrand^{1,2}

Correspondence

Xavier Bertrand
xavier.bertrand@univ-fcomte.fr

¹Service d'Hygiène Hospitalière et d'Épidémiologie Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjoz, Besançon, France

²UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Université de Franche-Comté, Besançon, France

³Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjoz, Besançon, France

Several recent reports have suggested that community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, particularly those harbouring genes for Pantón–Valentine leukocidin (PVL) or toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), are increasingly responsible for infections in hospitals. Here, a retrospective study was carried out to investigate whether antimicrobial resistance patterns could be used to detect these pathogens in a French university hospital. Isolates were characterized by antimicrobial susceptibility testing, PCR profiling (PVL genes and *tst*), PFGE typing and multilocus sequence typing. Demographic and clinical data were collected from all patients. For PVL-positive MRSA, the typical antimicrobial resistance pattern (susceptible to fluoroquinolones, non-susceptible to fusidic acid, kanamycin resistant and susceptible to gentamicin and tobramycin) had a sensitivity of 77.8% and a positive predictive value (PPV) of 100%. For *tst*-positive MRSA, the antimicrobial resistance pattern (susceptible to fluoroquinolones and non-susceptible to fusidic acid) had a sensitivity of 100% and a PPV of 72.4%. These results suggest that phenotypic rules based on antimicrobial resistance patterns are potentially useful for the detection of PVL- and *tst*-positive MRSA isolates.

Received 6 February 2009

Accepted 24 June 2009

INTRODUCTION

Since the early 1970s, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has spread throughout the world, becoming highly endemic in many geographical areas. This major nosocomial pathogen is associated with high rates of morbidity and mortality in hospitals worldwide (Cosgrove *et al.*, 2005). Until recently, the French MRSA problem was limited to hospitals, and MRSA infections were mostly acquired in hospital units (Robert *et al.*, 2005). The emergence of community-associated MRSA (CA-MRSA) producing Pantón–Valentine leukocidin (PVL) in patients with no recognized risk factors for MRSA infection is a source of particular concern (Vandenesch *et al.*, 2003; Diep *et al.*, 2006). Most PVL-producing MRSA strains isolated in France belong to a single clone of sequence type 80 (ST80) (Vandenesch *et al.*, 2003). However, another MRSA

clone, producing toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1), belonging to ST5 has recently been detected in France and Switzerland, in community-acquired infections in some cases (van der Mee-Marquet *et al.*, 2003; Durand *et al.*, 2006). The antimicrobial resistance patterns of these clones are relatively stable. Both are susceptible to fluoroquinolones (Robert *et al.*, 2005; Durand *et al.*, 2006), whereas most nosocomial MRSA strains isolated in French hospitals are resistant to fluoroquinolones (Thouverez *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2004). Thus, antimicrobial resistance pattern may be a powerful marker for detecting PVL- and TSST-1-producing MRSA. We aimed to determine whether a laboratory hospital surveillance programme based on antimicrobial resistance patterns could identify these pathogens efficiently.

METHODS

Setting and study period. Besançon Hospital is a university-affiliated hospital with 1200 acute-care beds in 59 units (35 medical units, 21 surgical units and three intensive care units). The specialties at this hospital include cardiothoracic surgery and organ and bone

Abbreviations: CA, community-associated; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; FQS, susceptible to fluoroquinolones; FQR, resistant to fluoroquinolones; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PPV, positive predictive value; PVL, Pantón–Valentine leukocidin; ST, sequence type.

marrow transplantation. Approximately 50 000 inpatients are admitted per year, for a total of 350 000 patient days. We collected data over a 4-year period from 1 January 2004 to 31 December 2007.

Bacteriological culture and antimicrobial susceptibility testing.

S. aureus was identified from clinical specimens (screening samples were excluded) on the basis of microscopy findings and colony appearance, coagulase tests and Staphyslide agglutination testing (bioMérieux). The susceptibility of isolates to antimicrobial drugs was determined by the disc diffusion method. Isolates were classified as susceptible, intermediate or resistant, according to the criteria recommended by the Antibiogram Committee of the French Microbiology Society.

Molecular typing and detection of *mecA* and toxin genes.

Non-duplicate MRSA isolates susceptible to fluoroquinolones (FQS-MRSA) were collected. For each FQS-MRSA, two non-duplicate MRSA isolates resistant to fluoroquinolones (FQR-MRSA) from the same year were randomly selected. Isolates were genotyped by determining their total DNA macrorestriction pattern by PFGE (CHEF DRIII; Bio-Rad) using *Sma*I, as described previously (Bertrand *et al.*, 2000). We used GelCompar software (Applied Maths) to establish a DNA similarity matrix based on the Dice coefficient (2×2 strain comparisons). A dendrogram was constructed using the unweighted pair-group method for clustering arithmetic averages with the Dice coefficient. We ensured that the gels were comparable by including *S. aureus* NCTC 8325 as a reference, and results were interpreted according to international recommendations: isolates with no more than six fragment differences were considered to be subtypes of a pulsotype (belong to the same clone) (Tenover *et al.*, 1995). For PCR methods, genomic DNA was extracted using standard procedures. Sequences specific for the *mecA* gene, PVL genes (*lukS-PV* and *lukF-PV*) and the *tst* gene (encoding TSST-1) were detected by PCR, as described elsewhere (Jarraud *et al.*, 2002). Multilocus sequence typing was performed for one randomly selected isolate of the major PFGE patterns as described previously (Enright *et al.*, 2000).

Data for patients. For each MRSA isolate included, data concerning the bacterial isolate (site of isolation and date of sampling) and the patient (age, sex, location of care and date of admission) were collected by reviewing the patient's medical records. We also determined whether the MRSA isolate met the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) definition for CA-MRSA (Buck *et al.*, 2005): 'lack of exposure to the healthcare environment' (specimen for culture obtained during an outpatient visit or within 48 h of hospitalization from patients with no history of the following: surgery, hospitalization, dialysis or admission to a long-term care facility within the previous year, presence of an indwelling catheter or a percutaneous medical device at the time of culture specimen collection or previous isolation of MRSA).

Data analysis. Data were compiled in an electronic Excel database. We evaluated the value of antimicrobial resistance patterns as a

marker of PVL- and/or *tst*-positive MRSA strains by determining the performance characteristics of several combinations of antimicrobial resistance. We assessed the significance of differences between groups by carrying out Student's *t*-test or a Mann-Whitney U-test for continuous variables, as appropriate, and Fisher's exact test or a Pearson χ^2 test for categorical variables. All analyses were two-tailed and a *P* value of less than 0.05 was considered significant. We used Stata software version 10.0 for the analysis.

RESULTS

From January 2004 to December 2007, 4622 non-duplicate isolates of *S. aureus* were recovered from clinical specimens in our hospital. We identified 962 of these isolates as MRSA strains, 56 of which were susceptible to fluoroquinolones (5.8% of all MRSA isolates) (Table 1). Forty-nine (87.5%) of these isolates were available for study. These 49 isolates and 98 randomly selected FQR-MRSA isolates contained the *mecA* gene. Nine FQS-MRSA isolates contained PVL genes (two, three, one and three in 2004, 2005, 2006 and 2007, respectively) and 21 FQS-MRSA isolates contained the *tst* gene (three, seven, seven and four in 2004, 2005, 2006 and 2007, respectively). None of the FQS-MRSA isolates were positive for both toxin genes and all FQR-MRSA isolates were negative for these genes. Twenty-eight of the 29 isolates (96.6%) susceptible to fluoroquinolones but not to fusidic acid produced either PVL ($n=7$) or TSST-1 ($n=21$). Moreover, PVL-positive MRSA isolates had a specific aminoglycoside resistance pattern: they were resistant to kanamycin and susceptible to gentamicin and tobramycin (Table 2). The *tst*-positive MRSA isolates ($n=21$) were either susceptible to gentamicin and resistant to both kanamycin and tobramycin (61.9%) or susceptible to all three aminoglycosides (38.1%). Seven of the nine PVL-positive MRSA isolates displayed the following typical antimicrobial resistance pattern: susceptibility to fluoroquinolone but not to fusidic acid, resistance to kanamycin and susceptibility to gentamicin and tobramycin. The performance characteristics of this antimicrobial resistance pattern as a phenotypic system for detecting and predicting PVL production by MRSA isolates were as follows (Table 3): sensitivity=77.8% [95% confidence interval (CI) 40.2–96.1] and positive predictive value (PPV)=100% (95% CI 56.1–100). For TSST-1-positive MRSA isolates, an antimicrobial resistance pattern consisting of susceptibility to fluoroquinolones but not to fusidic acid gave a sensitivity of 100% (95% CI 80.8–100) and a PPV of 72.4% (95% CI

Table 1. Clinical MRSA isolates obtained at Besançon Hospital from 2004 to 2007

Type of bacterial isolate	No. of isolates (% of MRSA among <i>S. aureus</i>)			
	2004	2005	2006	2007
Non-duplicate <i>S. aureus</i> isolates	980	1221	1201	1220
Non-duplicate MRSA isolates	233 (23.8)	268 (21.9)	247 (20.6)	214 (17.5)
Non-duplicate MRSA isolates susceptible to fluoroquinolones	14 (6.0)	13 (4.9)	14 (5.7)	15 (7.0)

Table 2. Antimicrobial resistance and PFGE patterns of MRSA clinical isolates: comparison of PVL gene-positive (PVL⁺), *tst*-positive (*tst*⁺) and fluoroquinolone-resistant (PVL⁻ and *tst*⁻) strains

Results are shown as number (%) of isolates. NS, Not significant.

Characteristic	FQS, PVL ⁺ (n=9)	FQS, <i>tst</i> ⁺ (n=21)	FQS, PVL ⁻ and <i>tst</i> ⁻ (n=19)	FQR, PVL ⁻ and <i>tst</i> ⁻ (n=98)	P*	P†	P‡
Antimicrobial resistance patterns§							
Gentamicin	0	0	2 (10.5)	5 (5.1)	NS	NS	NS
Kanamycin	9 (100)	13 (61.9)	13 (68.4)	73 (74.5)	NS	NS	NS
Tobramycin	0	13 (61.9)	13 (68.4)	73 (74.5)	<0.001	NS	0.003
Erythromycin	4 (44.4)	3 (14.3)	7 (36.8)	61 (62.2)	NS	<0.001	NS
Clindamycin	1 (11.1)	0	1 (5.3)	56 (57.1)	0.012	<0.001	NS
Rifampicin	0	0	0	5 (5.1)	NS	NS	NS
Fusidic acid	7 (77.8)	21 (100)	1 (5.3)	15 (15.3)	<0.001	<0.001	NS
Fosfomicin	0	0	0	3 (3.1)	NS	NS	NS
PFGE pattern							
A	0	0	0	43 (43.9)	0.010	<0.001	NS
B	0	17 (81.0)	13 (68.4)	6 (6.1)	NS	<0.001	<0.001
C	0	1 (4.8)	1 (5.3)	14 (14.3)	NS	NS	NS
D	0	0	0	11 (11.2)	NS	NS	NS
E	0	2 (9.5)	0	9 (9.2)	NS	NS	NS
F	8 (88.9)	0	0	0	<0.001	NS	<0.001
G	0	0	0	3 (3.1)	NS	NS	NS
H	0	0	0	3 (3.1)	NS	NS	NS
I	0	0	1 (5.3)	1 (1.0)	NS	NS	NS
J	0	0	0	2 (2.0)	NS	NS	NS
Unique	1 (11.1)	1 (4.8)	4 (21.1)	6 (6.1)	NS	NS	NS

*PVL⁺ MRSA versus FQR-MRSA.

†*tst*⁺ MRSA versus FQR-MRSA.

‡PVL⁺ MRSA versus *tst*⁺ MRSA.

§Includes isolates with intermediate susceptibility as resistant.

||PFGE pattern with the restriction endonuclease *Sma*I.

52.5–86.6). If we took into account susceptibility to aminoglycosides, then the major pattern observed, consisting of susceptibility to gentamicin and resistance to

both kanamycin and tobramycin, gave a sensitivity of 61.9% (95% CI 38.7–81.0) and a PPV of 92.9% (95% CI 64.2–99.6).

Table 3. Performance characteristics of phenotypic resistance patterns as predictors of PVL- and *tst*-positive MRSA as a function of various combinations of antimicrobial resistances

Characteristic	Characteristic	Combinations of antimicrobial resistances*		
		FQ	FQ+FA	FQ+FA+G+K+T
PVL-positive MRSA	Sensitivity	100	77.8	77.8
	Specificity	71.0	84.1	100
	Positive predictive value	18.4	24.1	100
	Negative predictive value	100	98.3	98.6
<i>tst</i> -positive MRSA	Sensitivity	100	100	61.9
	Specificity	77.8	93.7	99.2
	Positive predictive value	42.9	72.4	92.9
	Negative predictive value	100	100	94.0

*Results are given as percentages. Major antimicrobial resistance patterns for PVL-positive MRSA (FQS, FA-non-susceptible, GS, KR, TS) and *tst*-positive MRSA (FQS, FA-non-susceptible, GS, KR, TR). FQ, Fluoroquinolones; FA, fusidic acid; G, gentamicin; K, kanamycin; T, tobramycin; S, susceptible; R, resistant.

PFGE analysis revealed that the 147 MRSA isolates clustered into 22 clones (Table 2): two major patterns including 43 isolates (A) and 36 isolates (B), respectively, eight minor patterns of between two and 16 isolates (C–J) and 12 unique patterns. Major pattern A comprised 43 FQR-MRSA isolates. Pattern B comprised 17 *tst*-positive MRSA isolates and 19 toxin-negative MRSA isolates (13 FQS-MRSA and six FQR-MRSA isolates). PFGE pattern F comprised only eight PVL-positive MRSA isolates. Multilocus sequence typing was performed for one randomly chosen isolate of the PFGE patterns A–F. PFGE patterns A, C, D and E belonged to ST8, whereas PFGE patterns B and F belonged to ST5 and ST80, respectively. The characteristics of the patients and sites of MRSA isolation are reported in Table 4. Patients infected with FQS-MRSA isolates – particularly PVL-positive MRSA ($P=0.008$) and *tst*-positive MRSA ($P=0.036$) isolates –

were significantly younger than those infected with FQR-MRSA isolates. Furthermore, most FQS-MRSA isolates were obtained from male patients (73.5 vs 42.9% for FQR-MRSA isolates; $P<0.001$), and only five of the nine PVL-positive MRSA isolates met the CDC definition for CA-MRSA. No significant difference in site of isolation was found between PVL-positive MRSA, *tst*-positive MRSA and FQR-MRSA isolates.

DISCUSSION

This study highlights three important issues. Firstly, MRSA isolates with PVL genes accounted for an estimated 1% (9/962) of the MRSA strains isolated at Besançon Hospital between 2004 and 2007, with all these isolates belonging to the European ST80 clone except one. Secondly, MRSA

Table 4. Demographic and clinical characteristics of patients infected with MRSA: comparison of PVL gene-positive (PVL⁺), *tst*-positive (*tst*⁺) and fluoroquinolone-resistant (PVL[−] and *tst*[−]) strains

Results are shown as number (%) of isolates. NS, Not significant.

Characteristic	FQS, PVL ⁺ (n=9)	FQS, <i>tst</i> ⁺ (n=21)	FQS, PVL [−] and <i>tst</i> [−] (n=19)	FQR, PVL [−] and <i>tst</i> [−] (n=98)	P*	P†	P‡
Location of care							
Surgical unit	5 (55.6)	11 (52.4)	8 (42.1)	29 (29.6)	NS	NS	NS
Non-surgical unit	3 (33.3)	9 (42.9)	7 (36.8)	61 (62.2)	NS	NS	NS
Intensive care unit	1 (11.1)	1 (4.8)	4 (21.1)	8 (8.2)	NS	NS	NS
Type of patient							
Outpatient	3 (33.3)	3 (14.3)	2 (10.5)	15 (15.3)	NS	NS	NS
Inpatient	6 (66.7)	18 (85.7)	17 (89.5)	83 (84.7)			
Age (years)							
Mean (SD)	50.0 (18.3)	57.2 (24.8)	53.6 (25.0)	68.8 (19.6)	0.008	0.036	NS
Median (range)	52.0 (27–82)	60.0 (0–92)	64 (1–83)	74.0 (1–98)			
Sex							
Male	6 (66.7)	15 (71.4)	15 (78.9)	42 (42.9)	NS	0.017	NS
Female	3 (33.3)	6 (28.6)	4 (21.1)	56 (57.1)			
Hospital stay in the past (within the previous year)	4 (44.4)	13 (61.9)	4 (21.1)	71 (72.4)	NS	NS	NS
Time to MRSA culture (days)							
Mean (SD)	4.7 (10.1)	6.2 (21.9)	13.6 (25.4)	12.8 (21.9)	NS	NS	NS
Median (range)	1 (0–31)	3 (0–43)	5 (0–111)	5 (0–150)			
CA-MRSA§	5 (55.6)	4 (19.0)	3 (15.8)	10 (10.4)	0.003	NS	NS
Site of isolation							
Blood	0	3 (14.3)	2 (10.5)	4 (4.1)	NS	NS	NS
Wound pus, deep	2 (22.3)	2 (9.5)	2 (10.5)	13 (13.3)	NS	NS	NS
Respiratory	1 (11.1)	1 (4.8)	5 (26.3)	12 (12.2)	NS	NS	NS
Intravascular device	1 (11.1)	1 (4.8)	1 (5.3)	1 (1.0)	NS	NS	NS
Urine	0	0	0	14 (14.3)	NS	NS	NS
Skin, soft tissue	4 (44.4)	10 (47.6)	8 (42.1)	41 (41.8)	NS	NS	NS
Other	1 (11.1)	4 (19.0)	1 (5.3)	13 (13.3)	NS	NS	NS

*PVL⁺ MRSA versus FQR-MRSA.

†*tst*⁺ MRSA versus FQR-MRSA.

‡PVL⁺ MRSA versus *tst*⁺ MRSA.

§Defined according to CDC criteria.

||Other: eye, oral cavity, etc.

harbouring *tst* genes accounted for approximately 2% (21/962) of all MRSA isolates. Most of these TSST-1-positive isolates (17/21) belonged to the ST5 'Geraldine clone' defined by the French National Reference Center for Staphylococci (Dauwalder *et al.*, 2008). Thirdly, PVL- or *tst*-positive MRSA isolates were characterized by a specific antimicrobial resistance pattern that was readily detectable over time. The proportion of MRSA isolates carrying PVL toxin genes was similar to that reported in a previous study of 12 French hospitals, including Besançon Hospital, between 1999 and 2003 (0.4–1.0%), suggesting stability over time (Robert *et al.*, 2005). We also found that only approximately half of these isolates (5/9) fulfilled the CDC definition for CA-MRSA; this finding is consistent with the results of several studies demonstrating that this entirely epidemiological definition is now of little use in distinguishing CA-MRSA from hospital-acquired MRSA isolates (Millar *et al.*, 2007; David *et al.*, 2008). Durand *et al.* (2006) suggested that *tst*-positive clones are acquired in both hospitals and the community in France. Our results seem to support this assertion: 19% of *tst*-positive MRSA isolates were classified as CA-MRSA according to the CDC definition. This invasion of the hospital setting by PVL- and *tst*-positive MRSA isolates constitutes a new challenge in terms of treatment and infection control strategies.

This study had several limitations. Firstly, it was a retrospective study, and prospective validation of these phenotypic rules is required. Secondly, this study was performed at a single centre, limiting the generalization of our findings. Lastly, random sampling of 98/906 FQR-MRSA is a small sample and does not exclude the possibility that FQR-MRSA may contain PVL or *tst* genes.

Despite these limitations, the development of phenotypic rules based on antimicrobial resistance patterns for predicting the presence of particular virulence factors may be a suitable approach to use in routine microbiological analyses. These rules should be reassessed frequently over time. Previous reports suggest that our findings may be extended to French MRSA and the European situation (Robert *et al.*, 2005; Durand *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 2007; Dauwalder *et al.*, 2008; Otter & French, 2008) and that microbiologists should be aware that MRSA isolates with a specific antimicrobial resistance pattern (susceptible to FQ and resistant to fusidic acid) are associated with the production of PVL or TSST-1. Jappe *et al.* (2008) stated in a recent report that 'in contrast to CA-MRSA from other continents, fusidic acid resistance represents a typical marker for the widespread CA-MRSA ST80 in Europe, especially in Germany'.

The dissemination of PVL-producing clones has been reported extensively. The 'USA300' clone has become the principal cause of community-onset *S. aureus* skin and soft-tissue infections in a number of areas of the USA, and the European ST80 clone has also spread widely throughout Greece and Algeria (Chini *et al.*, 2006; Bekkhoucha

et al., 2009). The spread of *tst*-positive MRSA clones has been described less frequently. In a recent study, Dauwalder *et al.* (2008) reported that a *tst*-positive clone (the Geraldine clone) and the European ST80 clone accounted for 6.3 and 3.6% of invasive MRSA isolates collected in France, respectively. We also recovered twice as many isolates from the Geraldine clone as from the European ST80 clone. The spread of such clones associated with potentially lethal infections (both PVL and TSST-1) and with potent superantigenic activity (TSST-1) or the ability to cause more serious and recurrent infections (PVL) is of major concern. Recognition of these MRSA clones is essential for the implementation of effective measures to control their spread.

REFERENCES

- Bekkhoucha, S. N., Cady, A., Gautier, P., Iitim, F. & Donnio, P. Y. (2009). A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean Sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**, 553–555.
- Bertrand, X., Thouverez, M. & Talon, D. (2000). Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in eastern France. *J Hosp Infect* **46**, 280–287.
- Bertrand, X., Claude, B., Chantelat, P., Paolini, M. C., Petitboulanger, N., Julienne, C., Bruand, L., Huguénin, Y., Mermet, F. & Talon, D. (2004). Regional surveillance of the evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): what results for what teaching? *Med Mal Infect* **34**, 264–269 (in French).
- Buck, J. M., Como-Sabetti, K., Harriman, K. H., Danila, R. N., Boxrud, D. J., Glennen, A. & Lynfield, R. (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000–2003. *Emerg Infect Dis* **11**, 1532–1538.
- Chini, V., Petinaki, E., Foka, A., Paratiras, S., Dimitracopoulos, G. & Spiliopoulou, I. (2006). Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton–Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* **12**, 29–34.
- Cosgrove, S. E., Qi, Y., Kaye, K. S., Harbarth, S., Karchmer, A. W. & Carmeli, Y. (2005). The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**, 166–174.
- Dauwalder, O., Lina, G., Durand, G., Bes, M., Meugnier, H., Jarlier, V., Coignard, B., Vandenesch, F., Etienne, J. & Laurent, F. (2008). Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* **46**, 3454–3458.
- David, M. Z., Glikman, D., Crawford, S. E., Peng, J., King, K. J., Hostetler, M. A., Boyle-Vavra, S. & Daum, R. S. (2008). What is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J Infect Dis* **197**, 1235–1243.
- Diep, B. A., Carleton, H. A., Chang, R. F., Sensabaugh, G. F. & Perdreau-Remington, F. (2006). Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **193**, 1495–1503.
- Durand, G., Bes, M., Meugnier, H., Enright, M. C., Forey, F., Liassine, N., Wenger, A., Kikuchi, K., Lina, G. & other authors (2006). Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol* **44**, 847–853.

- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **38**, 1008–1015.
- Jappe, U., Heuck, D., Strommenger, B., Wendt, C., Werner, G., Altmann, D. & Witte, W. (2008). *Staphylococcus aureus* in dermatology outpatients with special emphasis on community-associated methicillin-resistant strains. *J Invest Dermatol* **128**, 2655–2664.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J. & Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* **70**, 631–641.
- Millar, B. C., Loughrey, A., Elborn, J. S. & Moore, J. E. (2007). Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect* **67**, 109–113.
- Otter, J. A. & French, G. L. (2008). The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin Microbiol Infect* **14**, 670–676.
- Robert, J., Etienne, J. & Bertrand, X. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Pantone–Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000–2003. *Clin Microbiol Infect* **11**, 585–587.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233–2239.
- Thouverez, M., Muller, A., Hocquet, D., Talon, D. & Bertrand, X. (2003). Relationship between molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a French teaching hospital. *J Med Microbiol* **52**, 801–806.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T. & other authors (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone–Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* **9**, 978–984.
- van der Mee-Marquet, N., Lina, G., Quentin, R., Yaouanc-Lapalle, H., Fievre, C., Takahashi, N. & Etienne, J. (2003). Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists. *J Clin Microbiol* **41**, 4883–4884.
- Witte, W., Strommenger, B., Cuny, C., Heuck, D. & Nuebel, U. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Pantone–Valentine leukocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* **60**, 1258–1263.

2. Etude 2 – Etude écologique de l'efficacité des précautions complémentaires dans la gestion des patients colonisés ou infectés par *Acinetobacter baumannii*

2.1. Présentation de l'étude

De 1999 à 2006 la gestion au CHU de Besançon des patients présentant un prélèvement à visée diagnostique positif à *A. baumannii* (cas) a connu trois périodes. Une première période entre 1999 et 2001 (période 1) ; à la suite d'une épidémie causée par deux souches multi-résistantes de *A. baumannii* identifiées en 1994, les précautions complémentaires étaient recommandées pour tous les patients colonisés ou infectés par cette bactérie indépendamment du profil de résistance aux antibiotiques des souches. A partir de 2002 et jusqu'en 2004 (période 2), cette mesure a été abandonnée compte tenu de l'absence de cas groupés identifiés durant la période 1. De 2005 à 2006 (période 3), cette mesure était de nouveau recommandée face à une augmentation importante des cas au cours de la période 2.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de ces changements de pratiques d'hygiène sur l'incidence des cas, indépendamment d'autres facteurs de risque tels que la pression de sélection antibiotique.

Cette étude utilisait une approche écologique temporelle ; une analyse de régression de Poisson a été réalisée, avec comme unité statistique l'année. La variable réponse était le taux d'incidence des cas (/1000 patient-jours). Les pratiques d'hygiène (précautions complémentaires recommandées ou non), l'usage des antibiotiques systémiques J01 (DDJ/1000 patient-jours) ainsi que des données agrégées relatives aux patients (âge, sexe, score de McCabe...) estimées à partir des enquêtes de prévalence (une chaque année) étaient utilisées comme co-variables. A l'exception de la variable "année", les variables quantitatives ont été transformées en variables catégorielles avec comme valeur seuil le premier quartile. L'évolution des proportions de résistance aux antibiotiques étaient évaluées en tendance sur l'ensemble de la période d'étude et par la comparaison des trois périodes (périodes 1+3 *versus* période 2). Des souches sélectionnées de façon aléatoire ont été typées par PFGE (*Apal*).

2.2. Conclusion

Le taux d'incidence des cas (/1000 patient-jours) étaient significativement plus faible durant les périodes où les précautions complémentaires étaient recommandées : période 1 (0,17 [intervalle de confiance à 95%, IC95% = 0,14-0,19]) et période 3 (0,27 [0,23-0,31]) *versus* période 2 (0,35 [0,31-0,39]). Le nombre de patients avec au moins une hémoculture positive suivait le même schéma. L'analyse multivariée révélait que la mise en œuvre de précautions complémentaires était associée indépendamment et négativement au taux d'incidence des cas (RR=0,50 ; [IC95%=0,40-0,64] ; $p < 0,001$) ; soit une réduction de moitié du risque. Les résultats de l'analyse PFGE suggéraient que certains clones persistent pendant de longues périodes et diffusent dans un grand nombre de services de l'hôpital à la faveur probablement de la transmission croisée. Une tendance ascendante significative ($p < 0,001$) était observée sur l'ensemble de la période d'étude pour les proportions de résistance aux céphalosporines de troisième génération. Ces proportions étaient significativement plus élevées ($p < 0,001$) au cours des périodes où les précautions complémentaires étaient systématiquement recommandées (périodes 1 et 3). Par ailleurs, l'étude descriptive des séries temporelles mensuelles (**Figure 20 : données non publiées**) du taux d'incidence des cas et de la consommation d'antibiotiques met en relief deux éléments importants. D'une part, une superposition de la courbe de la consommation d'antibiotiques après un décalage de 5 mois avec celle du taux d'incidence des cas excepté au cours de la période 2. Ce dernier résultat suggère que le rôle de la pression de sélection antibiotique dans l'émergence des cas au cours de la période 2 est relativement plus faible au profit probablement de la transmission croisée. D'autre part, il faut noter l'existence d'une saisonnalité du taux d'incidence des cas (pic au troisième trimestre de chaque année), rapportée par ailleurs. Une limite potentielle de cette étude tient à l'usage d'une régression de Poisson qui requière des données non corrélées. Toutefois, certains auteurs ont suggéré qu'elle pouvait constituer une alternative viable à l'analyse de séries temporelles considérée comme la méthode de choix [177].

En conclusion, notre étude suggère que les précautions complémentaires, en plus des précautions "standard" limitent efficacement la diffusion d'*A. baumannii* dans le cadre hospitalier.

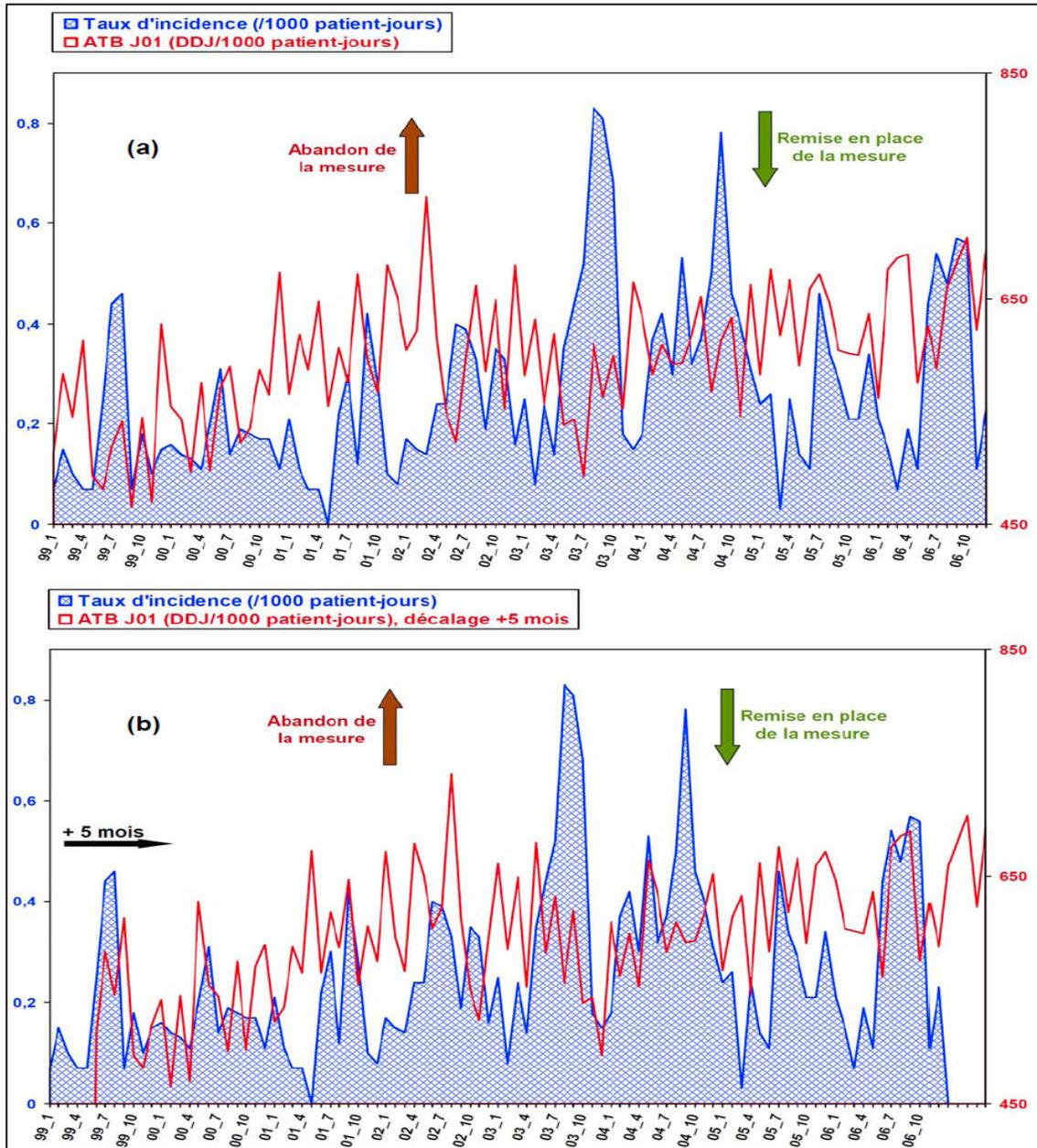


Figure 20. Evolution mensuelle entre 1999 et 2006 du taux d'incidence des patients colonisés ou infectés par *Acinetobacter baumannii* et de la consommation des antibiotiques J01 ((a) sans décalage et (b) avec un décalage de 5 mois) Recommandation ou non des précautions complémentaires.

2.3. Texte de l'article

GBAGUIDI-HAORE H, LEGAST S, THOUVEREZ M, BERTRAND X, TALON D. Ecological Study of the Effectiveness of Isolation Precautions in the Management of Hospitalized Patients Colonized or Infected With *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29, p. 1118-1123.

ORIGINAL ARTICLE

Ecological Study of the Effectiveness of Isolation Precautions in the Management of Hospitalized Patients Colonized or Infected With *Acinetobacter baumannii*

Houssein Gbaguidi-Haore, PharmD, MSc; Sophie Legast, PharmD; Michelle Thouverez, PhD;
Xavier Bertrand, PharmD, PhD; Daniel Talon, PharmD, PhD

OBJECTIVE. To assess the impact of isolation precautions on the incidence of patients colonized or infected with *Acinetobacter baumannii* (case patients) in a university hospital during the period from 1999 to 2006.

DESIGN. Ecological study.

SETTING. The Besançon University Hospital in France, a 1,200-bed acute care hospital with approximately 50,000 admissions per year.

METHODS. Using Poisson regression analysis, we evaluated a total of 350,000 patient-days to determine the annual incidence of case patients. This annual incidence was used as the outcome variable, and infection control practices, antibiotic use, and other aggregated data regarding patients' age, sex, McCabe score, and immune status were used as covariates.

RESULTS. The implementation of isolation precautions was independently and negatively associated with the incidence of patients colonized or infected with *A. baumannii* (relative risk, 0.50 [95% confidence interval, 0.40–0.64]; $P < .001$).

CONCLUSIONS. Our study suggests that the implementation of isolation precautions, in addition to standard precautions, effectively prevents the spread of *A. baumannii* in a hospital setting.

Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29:1118-1123

Acinetobacter baumannii is an emerging opportunistic pathogen that has been implicated in outbreaks of disease in hospitals worldwide and that has, in particular, affected patients with severe underlying diseases (malignancy, chronic lung disease, burns, or immunosuppression) who have had previous antimicrobial treatment.¹⁻⁴ The management of these outbreaks is difficult, because this pathogen is able to develop resistance to multiple classes of antibiotics⁵⁻¹⁰ and to survive in hospitals.^{11,12} Both multidrug resistance, which constitutes a considerable challenge for clinicians, and prolonged environmental survival, which increases the risk of horizontal transmission by healthcare workers, are key factors contributing to the spread of *A. baumannii* from patients and environmental reservoirs. Thus, controlling outbreaks of *A. baumannii* infection requires both the use of appropriate antibiotic therapy and the implementation of suitable isolation precautions involving adequate cleaning procedures to control the environmental contamination.¹³

At the Besançon University Hospital, the management of patients with clinical specimens positive for *A. baumannii* included 3 periods. The first period, from 1999 to 2001 (hereafter, period 1), followed the identification in 1994 of an

epidemic of *A. baumannii* colonization or infection linked to the spread of 2 multidrug-resistant epidemic strains¹⁴; during this period, isolation precautions were implemented for all patients identified as colonized or infected with this microorganism, whatever the antibiotic susceptibility of the strain isolated. During the second period from 2002 to 2004 (hereafter, period 2), the systematic implementation of isolation precautions was stopped as a consequence of the absence of clusters of cases of colonization or infection due to a strain with a multidrug-resistant phenotype in our hospital from 1999 to 2001. The third period, from 2005 to 2006 (hereafter, period 3), saw changes associated with an increase in the number of patients colonized or infected with *A. baumannii*; the infection control department of our hospital recommended the reimplementation of isolation precautions for such patients in 2005. We report the findings of a temporal ecological study assessing the consequences of these changes in infection control practices (ie, isolation precautions) on the annual incidence of colonization or infection due to *A. baumannii*, independent of other collective risk factors such as antibiotic selective pressure.

From the Service d'Hygiène Hospitalière et d'Epidémiologie Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjot, Besançon, France (all authors). Received May 29, 2008; accepted July 31, 2008; electronically published November 4, 2008.

© 2008 by The Society for Healthcare Epidemiology of America. All rights reserved. 0899-823X/2008/2912-0004\$15.00. DOI: 10.1086/592697

METHODS

Hospital Setting and Study Period

Our study was performed at the Besançon University Hospital in Besançon, France, a 1,200-bed acute care hospital with approximately 50,000 admissions per year, giving a total of 350,000 patient-days. Data were collected from 1999 to 2006.

Definitions

Case patients were defined as patients from whom an *A. baumannii* isolate was recovered from a clinical specimen obtained during the study period. Only the first clinical specimen positive for *A. baumannii* that was obtained from the patient was included. We did not collect any clinical data on case patients that would have allowed us to distinguish between infection and simple colonization. Thus, all patients with clinical specimens positive for *A. baumannii* were considered to be either colonized or infected with *A. baumannii*.

Data Collection

Aggregated demographic data (ie, age and sex) and clinical data (ie, severity of illness defined by the McCabe score¹⁵ and immune status) for patients admitted to our hospital were estimated from the point-prevalence survey that was performed each year in June. In practical terms, the variables used in our study were the percentages of patients who were more than 60 years old, who were male, who had a McCabe score of 1 (indicating the presence of an ultimately fatal disease) or 2 (indicating the presence of a rapidly fatal disease), and who had an immunocompromised status (ie, a patient who had malignant hemopathy or metastatic cancer, or who had received an immunosuppressive treatment or radiotherapy, or who was infected with the human immunodeficiency virus with a CD4 count of less than 500 cells/L). The quantities of all J01 antibiotics (ie, antibiotics for systemic use) delivered from 1999 to 2006 were provided by the pharmacy information system. Data on the rate of use of these antibiotics were expressed in defined daily doses per 1000 patient-days for each year, following the recommendations of the World Health Organization.¹⁶ These values were used to estimate antibiotic selective pressure.

Microbiological Analysis and Genotyping

Standard methods and media were used for isolation of the microorganisms from clinical specimens. The API 20NE system (bioMérieux) was used to identify *A. baumannii*. Antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method, and the results were interpreted according to the guidelines of the Antibigram Committee of the French Society for Microbiology.¹⁷ Strains with intermediate susceptibility were considered resistant in our study.

A. baumannii clinical isolates randomly chosen from among the strains available were typed. In brief, a method previously developed in our laboratory was used for macro-

restriction analysis of total chromosomal DNA using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).¹⁸ DNA was digested with *Apa*I, and fragments were separated in a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad). We used the GelCompar software (Applied Maths) to establish a DNA similarity matrix based on the Dice coefficient (2-by-2 strain comparisons). A dendrogram was constructed by using the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA). We ensured that the PFGE gels were comparable by including samples of *Sma*I-digested DNA of the *Staphylococcus aureus* strain NCTC 8325 as an internal reference. PFGE DNA patterns were compared and interpreted according to the criteria of Tenover et al.¹⁹; those differing by 6 fragments or less were considered to belong to the same clone.

Isolation Precautions

In our hospital, standard precautions are required for all hospitalized patients. These standard precautions include performance of proper hand hygiene; use of gloves, gown, mask, eye protection, or face shield, depending on the anticipated exposure; and use of safe injection practices. Systematic use of contact isolation precautions was recommended by the infection control department for patients with a clinical specimen positive for *A. baumannii* during period 1 (1999–2001) and period 3 (2005–2006). These contact isolation precautions require that the patient be housed in a private room or be cohorted with other patients who are also colonized or infected, that healthcare workers wear gloves and gowns for all contacts with the patient and the patient's surrounding environment, and that healthcare workers use an alcohol-based hand rub before leaving the patient's room. These measures were not used during period 2 (2002–2004).

Statistical Analysis

Our study approach was ecological, with 1 year as the statistical unit. Thus, all data were aggregated for each year. To explore the relationship between the number of cases of colonization or infection with *A. baumannii* and the recommendation to implement isolation precautions, a multiple Poisson regression model was built. The outcome variable was the incidence of such cases per year. Independent covariates were antibiotic selective pressure (ie, antibiotic consumption, measured in defined daily doses per 1,000 patient-days) and the percentages of patients who were more than 60 years old, who were male, who had a McCabe score of 1 or 2, who had an immunocompromised status, and/or who were subject to infection control practices (coded as a binary variable corresponding to the time periods with and without the recommendations that contact isolation precautions be applied). To interpret how a patient's risk of colonization or infection with *A. baumannii* changed according to the continuous, scaled covariates, relative risks (RRs) were determined and reported for the upper quartiles of exposure (with the lowest quartiles as the control group), along with their

TABLE 1. Incidence Rate of Patients Colonized or Infected With *Acinetobacter baumannii* According to the Demographic and Clinical Characteristics of the Patients Admitted to Our Hospital

Characteristics	Period 1			Period 2			Period 3	
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
No. of patients admitted	51,125	50,792	50,811	49,138	49,331	49,546	50,023	51,160
No. of patient-days	336,918	347,333	333,523	327,958	324,643	326,480	331,601	327,423
Age >60 years, % of patients ^a	48.0	49.0	49.5	49.7	49.9	48.1	46.5	45.5
Male sex, % of patients ^a	50.0	51.0	51.0	51.3	50.4	50.1	55.2	50.0
McCabe score of 1 or 2, % of patients ^a	27.0	28.0	27.8	26.7	32.0	30.8	37.2	29.5
Immunocompromised status, % of patients ^a	16.0	17.0	17.5	11.4	15.1	16.2	19.9	17.5
Antibiotic selective pressure, DDD per 1,000 patient-days	532.44	558.23	608.93	614.58	578.66	608.81	628.52	646.47
Implementation of isolation precautions	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes	Yes
No. of cases ^b	58	58	54	84	124	134	78	98
No. of patients with 1 or more <i>A. baumannii</i> -positive blood culture results ^c	0	1	5	7	17	13	5	6
Incidence rate								
Cases per 1000 patient-days	0.17	0.17	0.16	0.26	0.38	0.41	0.24	0.30
95% CI	0.13–0.22	0.13–0.22	0.12–0.21	0.21–0.32	0.32–0.46	0.35–0.49	0.19–0.30	0.24–0.37

NOTE. CI, confidence interval; DDDs, defined daily doses.

^a Data related to patients admitted to our hospital were estimated from the point-prevalence survey that was performed each year in June.

^b Only the first clinical specimen positive for *A. baumannii* that was obtained from the patient was included.

^c Not always the first clinical specimen positive for *A. baumannii*.

corresponding 95% confidence intervals (CIs). Univariate analyses were carried out first. Variables with a *P* value of .20 or less were included in the multivariate analysis. Finally, the year (coded as a continuous variable) was entered in the full model, to account for the underlying annual trend. This model was tested for overdispersion by comparing the deviance with its degrees of freedom; this provided a measure of the goodness of fit. To determine the evolution of the rates of antibiotic resistance of the *A. baumannii* clinical isolates, an analysis for linear trend in proportions was used. The χ^2 test or the Fisher exact test was used, as appropriate, to compare data for periods 1 and 3 with data for period 2. The software package Stata, version 8.0 (Stata), was used for the

analysis. All statistical tests were 2-tailed, and a *P* value of less than .05 was considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of Hospitalized Patients and Cases

From 1999 to 2006, a total of 688 patients had at least 1 clinical specimen that was positive for *A. baumannii*, corresponding to an incidence rate of 0.26 cases per 1,000 patient-days for the whole study period. Table 1 details the incidence rate according to year, implementation of isolation precautions, the characteristics of hospitalized patients, and antibiotic selective pressure. The incidence of cases of *A. bau-*

TABLE 2. Relative risk (RR) Estimates for Patients Colonized or Infected With *Acinetobacter baumannii*, Calculated Using Univariate and Multivariate Poisson Regression Models

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	RR (95% CI)	<i>P</i>	RR (95% CI)	<i>P</i>
Age >60 years	0.96 (0.81–1.14)	.641		
Male sex	1.14 (0.95–1.36)	.157	0.78 (0.59–1.03)	.077
McCabe score of 1 or 2	1.28 (1.07–1.54)	.008	1.29 (0.99–1.70)	.063
Immunocompromised status	0.75 (0.64–0.89)	.001	1.02 (0.80–1.31)	.856
Greater antibiotic selective pressure	1.71 (1.40–2.09)	<.001	0.86 (0.57–1.31)	.489
Isolation precautions implemented	0.59 (0.51–0.69)	<.001	0.50 (0.40–0.64)	<.001
Year	1.10 (1.07–1.14)	<.001	1.08 (0.99–1.17)	.061

NOTE. RR estimates are reported for upper quartiles, using the lowest quartiles as the control group. CI, confidence interval; DDDs, defined daily doses.

TABLE 3. Evolution of Antibiotic Resistance Rates of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates at the Besançon University Hospital, From 1999 to 2006

Antibiotic(s)	Percentage of isolates that were resistant, by year								<i>P</i> , periods 1 and 3 vs period 2	
	Period 1		Period 2			Period 3				
	1999 (<i>n</i> = 58)	2000 (<i>n</i> = 58)	2001 (<i>n</i> = 54)	2002 (<i>n</i> = 84)	2003 (<i>n</i> = 124)	2004 (<i>n</i> = 134)	2005 (<i>n</i> = 78)	2006 (<i>n</i> = 98)	For RR ^a	For resistance rate ^b
Tic-Clav	27.9	23.3	20.0	11.8	19.0	17.7	11.7	17.5	.357	.047
Pip-Taz	12.5	17.4	4.3	7.2	17.2	12.9	11.6	14.5	.774	.560
Ceftazidime	62.1	43.1	72.2	50.0	52.4	42.4	87.0	85.7	<.001	<.001
Cefepime	47.9	41.3	65.2	55.4	54.1	43.2	87.0	86.5	<.001	<.001
Imipenem	0	0	1.9	0	0	0	0	0	.99	.99
Ciprofloxacin	37.3	20.0	45.8	51.9	37.3	34.7	44.2	34.7	.366	.901
Amikacin	15.5	12.1	9.3	17.9	13.7	8.4	13.0	6.1	.442	.078
Tobramycin	17.2	15.5	9.3	13.1	11.3	8.3	10.4	6.1	.847	.016

NOTE. Pip-Taz, piperacillin-tazobactam; RR, relative risk; Tic-Clav, ticarcillin-clavulanic acid.

^a Comparison of periods 1 and 3, in which contact isolation precautions were implemented, with period 3, in which they were not. The RR that an *A. baumannii* isolate would become resistant to ceftazidime was 1.52, and the RR that it would become resistant to cefepime was 1.38.

^b Resistance to Tic-Clav and tobramycin by *A. baumannii* isolates decreased significantly from 1999 to 2006; resistance to ceftazidime and cefepime by *A. baumannii* isolates increased significantly during the same period.

mannii colonization or infection per 1,000 patient-days was significantly lower during period 1 (RR, 0.17 [95% CI, 0.14–0.19]) and period 3 (RR, 0.27 [95% CI, 0.23–0.31]), when a recommendation for contact isolation precautions was implemented, and than during period 2 (RR, 0.35 [95% CI, 0.31–0.39]), when the recommendation was withdrawn (period 1 vs period 2 [*P* < .001]; period 2 vs period 3 [*P* = .002]). Moreover, the mean number of patients per year with 1 or more *A. baumannii*-positive blood culture results was 2 patients (range, 0–5) during period 1 and was 6 patients (range, 5–6) during period 3, compared with 12 patients (range, 7–17) during period 2. Also, the mean number of hospital units per year with at least 4 cases of *A. baumannii* colonization or infection was 2 units during period 1 and was 5 units during period 3, compared with 9 during period 2. The most frequent anatomic sites from which *A. baumannii* isolates were recovered were skin and/or wounds (33.6% of isolates), the urinary tract (17.3%), and the respiratory tract (16.7%).

Univariate and Multivariate Analyses

The univariate analysis identified the following 5 variables as being significantly associated with the incidence of colonization or infection with *A. baumannii* (Table 2): a McCabe score of 1 or 2 (RR, 1.28 [95% CI, 1.07–1.54]; *P* = .008), immunocompromised status (RR, 0.75 [95% CI, 0.64–0.89]; *P* = .001), antibiotic selective pressure (RR, 1.71 [95% CI, 1.40–2.09]; *P* < .001), the implementation of isolation precautions (RR, 0.59 [95% CI, 0.51–0.69]; *P* < .001), and year (RR, 1.10 [95% CI, 1.07–1.14]; *P* < .001). In multivariate analysis (Table 2), only the implementation of isolation precautions remained significantly associated with the outcome

variable (RR, 0.50 [95% CI, 0.40–0.64]; *P* < .001). The implementation of isolation precautions was independently and negatively associated with the incidence of *A. baumannii* colonization or infection; the risk was decreased by half when isolation precautions were implemented. The test of overdispersion was not significant (*P* = .335), thus suggesting no important extra Poisson variability.

Antibiotic Resistance

The rates of resistance to third-generation cephalosporins (ceftazidime and cefepime) among *A. baumannii* clinical isolates were significantly higher during periods 1 and 3, when isolation precautions were implemented, than they were during period 2, when isolation precautions were withdrawn

TABLE 4. Distribution of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns of *Apal*-Digested Genomic DNA From Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates

Year of isolate recovery	No. of isolates				
	Clone A	Clone B	Microepidemic clones	Sporadic clones	Total
1999	2	0	1	1	4
2000	0	3	3	4	10
2001	0	1	4	2	7
2002	5	3	7	2	17
2003	0	3	1	0	4
2004	0	0	0	0	0
2005	0	1	2	4	7
2006	0	2	0	5	7

NOTE. Clones A and B were recovered from more than 4 patients; the microepidemic clones were recovered from 2–4 patients; the sporadic clones were recovered from only a single patient.

($P < .001$). A significant trend of increasing resistance to third-generation cephalosporins was observed during the study period ($P < .001$). For the other antibiotics, no significant difference in the rate of resistance between the 3 periods was found (Table 3). However, resistance to ticarcillin-clavulanic acid and also to tobramycin decreased significantly during the study period ($P = .047$ and $P = .016$, respectively). Only a single imipenem-resistant isolate was recovered during the 8-year period of our study.

PFGE Typing

Fifty-six randomly selected isolates were typed using PFGE, and they belonged to 27 clones (Table 4): 18 unique clones represented by only a single isolate (ie, sporadic clones), 7 clones represented by 2–4 isolates (ie, microepidemic clones), and 2 clones defined as epidemic that were represented by 7 isolates (clone A) and 13 isolates (clone B). The isolates in these epidemic clones were recovered during a 2-year period (clone A), in 4 different hospital units, and during a 6-year period (clone B), in 7 different hospital units.

DISCUSSION

Our study shows the impact of isolation precautions on the incidence of colonization or infection with *A. baumannii* among patients,²⁰ independent of other collective factors, including antibiotic selective pressure. Removal of the requirement to use specific barrier precautions was associated with an increase in the incidence of colonization or infection among patients; reimplementation of the requirement to use these precautions was associated with a decrease in the incidence. These changes were clearly reflected in the numbers of patients with *A. baumannii*-positive blood culture results. This increase was probably linked to the cross-transmission of epidemic clones that persisted for long periods and spread to a large number of hospital units. Also, antibiotic resistance rates, particularly the rate of resistance to third-generation cephalosporins, increased significantly while the recommendation for isolation precautions was enforced, and there was a significant upward trend throughout the study period. It seems that antibiotic-susceptible strains have a larger epidemic potential than do antibiotic-resistant strains. Several studies^{21,22} have shown the effectiveness of barrier precautions in controlling the transmission of multidrug-resistant organisms. Unlike standard precautions, contact isolation precautions require that the patient be placed in a private room or be cohorted with other patients who are also colonized or infected, that healthcare workers wear gloves and gowns for all contacts with the patient and the patient's surrounding environment, and that healthcare workers use an alcohol-based hand rub before leaving the patient's room. The ability of *A. baumannii* to persist in the hospital environment and the differences between contact isolation precautions and standard precautions are entirely consistent with contact iso-

lation precautions making a large contribution to controlling the transmission of *A. baumannii*.

Our study has potential limitations. First, Poisson regression requires the outcomes to be uncorrelated. However, a study by Kuhn et al.²³ suggests that Poisson regression is an attractive and viable alternative to time series analysis, which has been promoted as the method of choice for analysis of sequential observation over long time periods. We did not collect clinical data that allowed for the distinction between colonization and infection. The number of isolates available for PFGE typing was limited, and, consequently, we were unable to detect the cross-transmission of *A. baumannii* or to analyze the molecular epidemiology of this pathogen in our hospital. However, our PFGE typing findings suggested that some clones persisted and spread throughout our hospital. Another possible limitation is that it is likely that implementation of isolation precautions improves compliance with standard precautions. Therefore, it was difficult in our study to assess the share of the reduction in the incidence of cases of *A. baumannii* colonization or infection that were attributable to the implementation of isolation precautions. In conclusion, our study suggested that contact precautions, in addition to standard precautions, are useful and effective at preventing the spread of *A. baumannii* in a hospital setting.

ACKNOWLEDGMENTS

Potential conflicts of interest. All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Address reprint requests to Xavier Bertrand, PharmD, PhD, Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjot, Besançon, 25030 Besançon cedex, France (xavier.bertrand@univ-fcomte.fr).

REFERENCES

1. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:148-165.
2. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3542-3547.
3. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, et al. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:837-843.
4. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 453-460.
5. Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:22-29.
6. Falagas ME, Kopterides P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect* 2006; 64:7-15.
7. Poirel L, Lebesse E, Heritier C, Patsoura A, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial spread of OXA-58-positive carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a paediatric hospital in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:1138-1141.

8. Baran G, Erbay A, Bodur H, et al. Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Int J Infect Dis* 2008; 12:16-21.
9. Hoban DJ, Bouchillon SK, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase producers and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* throughout the United States and comparative in vitro activity of tigecycline, a new glycolcycline antimicrobial. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:423-428.
10. Stephens C, Francis SJ, Abell V, DiPersio JR, Wells P. Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. *Am J Infect Control* 2007; 35:212-215.
11. Jawad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1938-1941.
12. Wendt C, Dietze B, Dietz E, Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1394-1397.
13. Aygun G, Demirkiran O, Utku T, et al. Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2002; 52:259-262.
14. Mulin B, Talon D, Viel JF, et al. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:569-576.
15. McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteremia. I. Etiology and ecology. *Arch Intern Med* 1962; 110:847-855.
16. World Health Organization. Anatomic Therapeutic Chemical (ATC) classification index with defined daily doses (DDDs). Oslo, Norway: WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology; 2001.
17. Soussy CJ, Carret G, Cavallo JD, et al. Antibiogram Committee of the French Microbiology Society. Report 2000-2001 [in French]. *Pathol Biol (Paris)* 2000; 48:832-871.
18. Talon D, Dupont MJ, Lesne J, Thouverez M, Michel-Briand Y. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bacteriol* 1996; 80:277-282.
19. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-2239.
20. Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Muller A, Thouverez M, Talon D. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in a French university hospital: are isolation precautions necessary, useful or non-essential? *J Hosp Infect* 2005; 61:354-355.
21. Aboelela SW, Saiman L, Stone P, Lowy FD, Quiros D, Larson E. Effectiveness of barrier precautions and surveillance cultures to control transmission of multidrug-resistant organisms: a systematic review of the literature. *Am J Infect Control* 2006; 34:484-494.
22. Safdar N, Marx J, Meyer NA, Maki DG. Effectiveness of preemptive barrier precautions in controlling nosocomial colonization and infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a burn unit. *Am J Infect Control* 2006; 34:476-483.
23. Kuhn L, Davidson LL, Durkin MS. Use of Poisson regression and time series analysis for detecting changes over time in rates of child injury following a prevention program. *Am J Epidemiol* 1994; 140:943-955.

3. Etude 3 – Utilisation de l'analyse des séries temporelles pour évaluer les mesures de contrôle de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

3.1. Présentation de l'étude

L'objectif de cette étude était de déterminer la relation temporelle entre différentes mesures d'hygiène, l'usage des antibiotiques et l'incidence du SARM dans un hôpital universitaire français.

L'étude s'appuyait sur des données mensuelles collectées entre 2000 et 2008 à l'échelle de l'hôpital. Ces différentes séries temporelles correspondaient à l'incidence des cas de SARM acquis (dépistage ou diagnostic positif après 48 heures d'hospitalisation), la pression de colonisation exercée par les SARM importés (prélèvement positif dans les 48 heures suivant l'admission), l'usage de différentes classes d'antibiotiques systémiques J01 et les mesures d'hygiène (utilisation de produits hydro-alcooliques, de surblouses, de gants). Une analyse multivariée de séries temporelles a été conduite pour évaluer la relation contemporaine et à différents décalages temporels entre la densité d'incidence des SARM acquis (variable dépendante) et les mesures d'hygiène, l'usage des antibiotiques et la pression de colonisation des SARM importés.

3.2. Conclusion

La modélisation révélait une corrélation significative et positive entre la densité d'incidence des SARM acquis et la pression de colonisation des SARM importés, l'usage d'antibiotiques tels que les quinolones, les macrolides et les aminoglycosides ainsi que l'usage de gants. Inversement, une corrélation significative et négative était retrouvée pour les produits hydro-alcooliques, les surblouses et l'usage de la pénicilline. Les facteurs retenus dans le modèle final expliquaient 60,4% des variations mensuelles de la densité d'incidence du SARM acquis au cours de la période d'étude.

Finalement, cette étude montre que l'admission de patients positifs à SARM, l'usage d'antibiotiques et des mesures d'hygiène ont un impact sur l'incidence des SARM acquis. Elle suggère que nos efforts devraient se focaliser sur l'observance de la friction-désinfection des mains. Par ailleurs, il faudrait aussi s'interroger sur l'utilisation systématique de gants lors des soins chez les patients porteurs de SARM. Ce dernier point a été tranché par les nouvelles recommandations des précautions complémentaires "contact" ; port de gants dans le cadre des précautions "standard" chez les patients positifs à SARM [178].

3.3. Texte de l'article

JOCHAULT L, GBAGUIDI-HAORE H, SLEKOVEC C, TALON D, THOUVEREZ M, BERTRAND X. Using time-series analysis to evaluate control measures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (soumis à *Infection Control and Hospital Epidemiology*, mars 2010).

Using time-series analysis to evaluate control measures of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus

Loic Jochault, MD; Houssein Gbaguidi-Haore, PharmD, MSc; Céline Slekovec; Daniel Talon, PharmD, PhD; Michelle Thouverez, PhD; Xavier Bertrand, PharmD, PhD.

Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, UMR 6249 Chrono-environnement, Université de Franche-Comté.

Corresponding author:

Xavier Bertrand,

Address: Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon. 3 Bd Fleming, 25030 Besançon, Cedex, France.

Tel: (33) 3 81669053.

Fax: (33) 3 81668914.

E-mail: xavier.bertrand@univ-fcomte.fr

Key-words: MRSA, time-series analysis, alcohol hand-rub, barrier precaution, gloves

Word count: 2 503

Abstract

OBJECTIVE. To determine the temporal association between various infection control practices, the use of antibiotics and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) incidence in a 1200-bed French university hospital.

METHODS. A multivariate time-series analysis was performed, based on monthly data from a 9 year period (January 2000-December 2008), to relate incidence of hospital-acquired MRSA with infection control practices, MRSA colonization pressure and antibiotic use.

RESULTS. Analysis showed positive significant relationships between the incidence of hospital-acquired MRSA and contemporary MRSA colonisation pressure, the use of antibiotics such as quinolones, macrolides and aminoglycosides and gloves use. Conversely, a global negative correlation was observed for alcohol-based hand-rub (ABHR) gowns and penicillins use. The model explained 60.4% of the variance in the monthly incidence of MRSA.

CONCLUSION. Our study showed that admission of MRSA patients, antibiotic use and infection control practices, contributed to the incidence of HA-MRSA. It suggests that efforts should be focused on high compliance of hand disinfection. Systematically donning gloves when caring for MRSA patients can also be questioned.

Introduction

Over the last decades, MRSA has spread throughout the world and has become highly endemic worldwide.^{1,2} In Europe, the frequency of MRSA among *S. aureus* blood isolates, is low (<2%) in Scandinavia, The Netherlands and Iceland, intermediate in central Europe (5 to 20%) and higher (>25%) in Southern Europe as well in the UK and Ireland. However, an unprecedented decrease in MRSA rates has been recently observed in several European countries (UK, France, Slovenia, Turkey), whereas other large countries such as Germany and Spain have stabilized their MRSA incidence. It is now well established that colonized and infected inpatients are the major reservoir of this pathogen and that the transient carriage of MRSA on the hands of hospital personnel is the most common mechanism of patient-to-patient transmission. Therefore, attempts to control the spread of MRSA have concentrated principally on transmission-based control policies.³ However, despite increased awareness, the incidence of hospital-acquired (HA) MRSA continues to raise, probably due to poor adherence to infection control practices. The Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines have reported that low adherence rates to hand hygiene practices of healthcare workers, averaging 40%, give rise to the increased MRSA incidence.³

If the need for implementing MRSA control strategies is not yet a matter of debate, it remains controversies on which infection control measures are efficient to reduce MRSA rates. In broad outline, two approaches are proposed. The first one can be qualified of active with screening of MRSA carriers, isolation or cohorting of positive patients, environmental cleansing and MRSA decolonization of patients and health care workers. The second approach considers that standard precautions are sufficient to control MRSA. In addition, guidelines for controlling MRSA in hospitals pay much less attention to antibiotic stewardship, although there was evidence of a relationship between antibiotic use and the spread of MRSA.⁴⁻⁷

The objective of this study was to determine the temporal association between various infection control practices, the use of antibiotics and MRSA incidence in a French university hospital, using a time-series analysis.⁸

Material and methods

Setting

The Besançon Hospital is a 1200-bed university-affiliated hospital in France that covers all main specialties and admits approximately 50,000 inpatients annually. For MRSA high-risk departments, the infection control department recommends MRSA screening on admission and once a week thereafter of all patients by sampling of the anterior nares. As a result, approximately 15% of patients admitted in our hospital were screened for MRSA. MRSA were also isolated from clinical samples taken according to signs of infection. In addition to the screening programme, we recommend standard infection control measures for all patients and additional contact barrier precautions for MRSA-positive patients: single rooms (or cohorts), use of dedicated material (gown, gloves and if indicated, masks), reinforcement of hand disinfection and additional environmental cleansing. There were no quantitative data available on compliance with infection control practices. The recommendations did not change during the course of the study period, but continuous education about hand hygiene and a regular retro-communication of hospitalisation units on their consumption of alcohol-based hand-rub (ABHR) were implemented. Only ABHR was recommended for hand hygiene and hands were washed before hand hygiene with water and plain soap only if they were visibly soiled.

Study period and data collection

Data were collected retrospectively from January 2000 to December 2008 and variables were calculated on a monthly basis for the entire hospital. MRSA cases were categorized as follows: imported cases (patients for whom screening or clinical sample tested positive within 48 hours of hospitalization) or hospital-acquired (patients with negative MRSA screening upon admission and subsequently positive for MRSA or patients without MRSA screening

upon admission and with sample tested positive after 48 hours of hospitalization). Each patient was counted only once, i.e. the first time MRSA was isolated, and duplicate isolates during the same hospital stay were excluded. The incidence density of MRSA acquisition was calculated as number of hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) cases per 1000 patient-days. The MRSA colonization pressure was calculated from the ratio of the number of imported MRSA-positive patient-days to the total number of patient-days. Patients were considered to be positive from the date of the sample to the date of discharge. Quantities of antibiotic for systemic use or group J01 of the WHO Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system were obtained from the pharmacy information system. The number of grams or international units were further converted into a number of DDD using the 2008 version of the ATC/DDD index following the recommendations of the WHO. To control for the population size, we determined the antimicrobial use density, expressed as DDD per 1,000 patient-days. Data were also collected on the dispensed quantities of medical masks (number of unit), gloves (number of unit), gowns (number of unit) and alcohol-based handrub (liters) and expressed as a ratio per 1000 patient-days.

Statistical analysis

Linear regression was used to determine if there were significant changes in the variables over the study period. Afterwards, we tested their stationarity with the augmented Dickey-Fuller test. Variables that were not stationary were integrated to make them stationary.

In a second step, we conducted time-series analysis to investigate the relationship between incidence of acquired MRSA, MRSA colonization pressure, antibiotic use and infection control practices. This technique, developed by Lopez-Lozano *et al.* and Monnet *et al.* was applied to our data according to methodology previously described.⁵ It was based on autoregressive integrated moving average (ARIMA) models, which were used to analyse the

temporal behaviour of a variable as a function of its previous values, its trends and any abrupt changes in the recent past. Once the basic characteristics of the series were established, the relationships between incidence of HA-MRSA, antibiotic use and infection control practices were quantified using dynamic time-series modeling techniques. Specifically, polynomial distributed lag (PDL) models were utilized for detection and quantification of lagged effects of antimicrobial use on resistance. The optimum PDL model for the datasets emerged via the 'general-to-specific' econometric methodology. This meant that initially, many possible independent variables were included in the model, some of which were ultimately found to be irrelevant. The model was then progressively simplified by eliminating these irrelevant independent variables. We determined the coefficient R^2 , corresponding to the percentage of the variance of the observed time-series explained by the model. In the model checking stage, the adequacy of the ARIMA model for the disturbance series in the dynamic regression model was examined using three checks: (i) statistical significance of the parameters; (ii) checking of autoregressive (AR) stationary parameters and the moving average (MA) invertibility parameters; and (iii) checking of residuals that effectively corresponded to white noise. The whole analysis was performed with Eviews 5.0 (Quantitative Micro Software, Irvine, CA, USA).

Results

Over the 9-year study period, there were 4,128 MRSA cases identified of whom 2,430 (58.9%) were classified as HA-MRSA and 1,698 (41.1%) were classified as imported. One thousand four hundred twenty one of HA-MRSA cases (58.5%) were identified through screening, whereas the remaining cases (41.5%) were identified with clinical samples. Seven hundred sixty of imported MRSA (44.8%) were isolated from patient screening, whereas the 938 remaining cases (55.2%) resulted from clinical samples. The average observed monthly HA-MRSA incidence and MRSA colonization pressure were respectively 0.56/1000 patient-days (range: 0.18-1.23) and 14.28 days/1000 patient-days (range: 6.62-25.68).

The global consumption of antibiotics remained stable during the study period. Trends in the use of the main classes were presented in Table 1. We observed significant increasing trends in the use of class J01D (β -lactams other than penicillins) and glycopeptides, whereas other classes (aminoglycosides and quinolones) showed a significant decreasing trend in their use. The decrease of fluoroquinolones was observed after implementation of new local guidelines for fluoroquinolones preservation at the end of 2006, as a result, the consumption of these antimicrobials which was stable between 2000 and 2006, decreased by 30 % between January 2007 and December 2008. Linear regression showed a significant positive trend for all infection control practices (Table 1). Of interest, the consumption of ABHRs increased constantly from 2.9 in 2000 to 22.1 L/1000 patient-days in 2008.

Multivariate time-series analysis showed significant relationships between the incidence of HA-MRSA and a number of potential explanatory variables (Table 2). Statistically significant positive relationships were observed for contemporary MRSA colonisation pressure, the use of antibiotics such as quinolones, macrolides and aminoglycosides with various time lags and glove use. Conversely, a global negative correlation was recovered for ABHR, gowns and penicillins use, whereas for these 3 variables, the sense of the effect may vary regarding to the

delay. For instance, ABHR use was negatively correlated with HA-MRSA incidence for a time lag of 2 months and positively for a time lag of 3 months. By cumulating the coefficients, the model shows that the increase of 1 L/1000 patient-days of ABHR led to decrease of 3.0% HA-MRSA incidence. Neither the use of masks, nor the use of other agents (β -lactams, other than penicillins and glycopeptides) was statistically significant in this model. One stochastic term was introduced into the model, i.e. an MA term with a lag time of 3 months (Table 3). This term reflects autocorrelation in the incidence of HA-MRSA, i.e. this incidence was related to the incidence observed in the previous months. The determination coefficient (R^2) of the final model was 0.604, this means that 60.4% of the variations of the monthly incidence of HA-MRSA over the study period were explained by the factors included in the model. A curve of the summed monthly use of all explanatory variables, taking into account their respective lags, was constructed and plotted on the same graph as the monthly incidence of HA-MRSA (Figure 1). In these figure, data were plotted using a 5-month moving average transformation. This transformation has no statistical value, but provided visual confirmation of the model.

Discussion

Our study, using time-series analysis, showed temporal relationships between the use of certain antibiotic classes, infection control activities and the incidence of HA-MRSA. Time series analysis has previously being applied to study the association between antibiotic use and MRSA,⁵ but only three recent studies also included infection control practices in their analysis.^{6, 9, 10} The key-points of these studies are presented in Table 3 and their findings are rather similar despite differences in variables included in the model, differences in MRSA incidence (from 0.074 to 1.5) and differences in ABHR use (from 1.7 to 55.1). The design of our study address limitations of previous works, i.e lack of MRSA colonization pressure (or admission cultures) in the study of Vernaz et al⁹ and absence of monthly data of ABHR use in the study of Aldeyab et al.⁶ We also include variables related to barrier precautions (gowns and gloves) which were not considered by Kaier et al.¹⁰

These studies found evidence of a role of antibiotics in driving MRSA cross-transmission, particularly fluoroquinolones, third generation cephalosporins and macrolides. Our results also showed a positive correlation between MRSA and fluoroquinolone, macrolides and aminoglycosides use. Surprisingly, a negative correlation was observed between penicillins use and MRSA. It was unclear, however, why a longer delay was needed to observe an effect of variations in macrolide use compared with fluoroquinolones. Further research is needed to clarify these points. Finally, our results are consistent with numerous studies, supporting a relationship between antimicrobial use and MRSA incidence.¹¹ The dissemination of MRSA clones does not necessarily require antimicrobial selective pressure. However, antimicrobials participate in MRSA spread as demonstrated by a recent systematic review which have shown that the risk of acquiring MRSA was 1.8 times higher in patients who had received antibiotics in the previous 4 months.⁷

In addition to antibiotic use, the model showed that MRSA colonization pressure is a major contributor to high HA-MRSA incidence as previously reported by others.^{10, 12} Once MRSA carriers were admitted, they will serve as a reservoir for subsequent MRSA transmission to other patients, hospital staff and the environment. Thus, active screening for MRSA carriage, such as performed in our hospital for 15 % of admitted patients may be an essential strategy to limit further spread, however it remains controversies regarding this issue.^{13, 14}

The landmark study of Pittet *et al.* allowed the rediscover of ABHR as a simple but key infection control measure.¹⁵ It has been proved to decrease infection rates significantly as a result of improved compliance. Our study, as well as many others, shows that increase of ABHR bulk orders and consequently ABHR use, was associated to a decrease of HA-MRSA incidence.^{6, 9, 16}

The final model also found a statistical relationship between incidence of HA-MRSA and infection control measures specifically dedicated to MRSA barrier precautions. Use of gowns and gloves were both significantly associated to HA-MRSA incidence, positively for gowns and negatively for gloves. In our hospital, we evaluate that gowns are mainly used in application of barrier precautions and our results suggest that use of gowns for cares of MRSA patients, and consequently specific barrier precautions, could be of interest to reduce MRSA cross-transmission. The negative correlation between incidence of HA-MRSA and use of gloves was not very surprising. Indeed, some studies casted doubts on the efficacy of gloves in recommendations for contact precaution, misuse of gloves causing more hazards than advantages, e.g. gloves were only changed in 16 to 19% of required situation.^{17, 18} However, these results should be considered carefully, the proportion of gloves specifically used for barrier precautions in our hospital, representing approximately 30-40% of total gloves use.

As infection control measures are generally applied in bundle, it is quite impossible to determine the individual impact of a specific measure. Moreover, if a measure is tested individually, it can be efficient by itself, but also modify the behaviour of health-care workers in adherence to others measures. Finally, it turns out to be difficult to evaluate the level of application of recommended infection control measures. It is likely that the success of a strategy depend more on the way of application of the measures than the measures themselves. Time-series methods which rely on aggregated, ecological level data, are potentially very useful to study the epidemiology of transmissible microorganisms, such as MRSA. This avoids, in particular, the problem of erroneously assuming independence of events and may also mitigate confounding. Our model explained 60% of the variability of HA-MRSA incidence, the 40% remaining may be due to other parameters such as nursing staff levels, environmental disinfection or level of compliance with hand hygiene.

In conclusion, our study showed that admission of MRSA patients, antibiotic use and infection control practices, contributed to the incidence of HA-MRSA during a 9-year period in a university hospital. Time-series analysis proved to be a powerful tool to determine these relationships and can establish a clear direction and size of the effect. Because the contribution that could be achieved via antibiotic use restriction was less certain, our results suggest that efforts should be focused on high compliance of hand disinfection with ABHR. Interestingly, our ABHR use increased by 4 L/1000 patient-days in 2009 and we observed a significant decrease (-18%) of HA-MRSA. Systematically donning gloves when caring for MRSA patient can also be questioned.

References

1. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008; 46 Suppl 5:S344-S349.
2. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 2006; 368:874-885.
3. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:362-386.
4. Muller A, Mauny F, Talon D, et al. Effect of individual- and group-level antibiotic exposure on MRSA isolation: a multilevel analysis. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:878-881.
5. Monnet DL, MacKenzie FM, Lopez-Lozano JM, et al. Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1432-1441.
6. Aldeyab MA, Monnet DL, Lopez-Lozano J M, et al. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 593-600.
7. Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA et al. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:26-38.
8. Harbarth S, Samore MH. Interventions to control MRSA: high time for time-series analysis? *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:431-433.
9. Vernaz N, Sax H, Pittet D, et al. Temporal effects of antibiotic use and hand rub consumption on the incidence of MRSA and *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:601-607.
10. Kaier K, Hagist C, Frank U, et al. Two time-series analyses of the impact of antibiotic consumption and alcohol-based hand disinfection on the incidences of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:346-353.
11. Dancer SJ. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 246-253.
12. Merrer J, Santoli F, Appere de Vecchi C, et al. Colonization pressure and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 718-723.
13. Harbarth S, Fankhauser C, Schrenzel J, et al. Universal screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission and nosocomial infection in surgical patients. *Jama* 2008; 299:1149-1157.
14. Jeyaratnam D, Whitty CJ, Phillips K, et al. Impact of rapid screening tests on acquisition of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: cluster randomised crossover trial. *Bmj* 2008; 336:927-930.
15. Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. *Lancet* 2000; 356:1307-1312.
16. Sroka S, Gastmeier P, Meyer E. Impact of alcohol hand-rub use on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an analysis of the literature. *J Hosp Infect* 2010; in press

17. Girou E, Chai SH, Oppein F, et al. Misuse of gloves: the foundation for poor compliance with hand hygiene and potential for microbial transmission? *J Hosp Infect* 2004 57:162-169.
18. Thompson BL, Dwyer DM, Ussery XT, et al. Handwashing and glove use in a long-term-care facility. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:97-103.

Acknowledgements: None

Transparency declarations: No conflicts of interest to declare

Funding: No specific funding was received for this study

TABLE 1. Characteristics of the monthly antimicrobial use and infection control practices in Besançon Hospital, January 2000-December 2008

Variables	Average monthly ^a (range)	Trends 2000-2008		Stationarity ^b
		coefficient	p	
Antibiotic class (ATC group)				
Antibiotic for systemic use (J01)	588.4 (466.8-740.4)	-0.252	0.116	Y
Penicillins use (J01C)	303.0 (234.5-386.7)	0.187	0.050	Y
β-lactams, other than penicillins use (J01D)	79.0 (58.9-101.4)	0.072	0.015	Y
Macrolides and relatives use (J01F)	31.8 (14.6-44.2)	-0.0003	0.850	Y
Aminoglycosides use (J01G)	22.6 (8.2-31.7)	-0.030	0.010	Y
Quinolones use (J01M)	97.7 (54.0-138.1)	-0.239	<0.0001	N
Glycopeptides use (J01XA)	25.7 (13.7-46.5)	0.152	<0.0001	Y
Infection control practices				
Alcohol-based hand-rub use	10.97 (1.5-31.9)	0.192	<0.0001	Y
Gloves use	11253.6 (1935.0-18490.9)	101.088	<0.0001	Y
Masks use	1313.2 (527.4-2952.9)	3.120	0.004	Y
Gowns use	645.9 (517-812.2)	1.418	<0.0001	N

^a expressed in DDD/1000 patient-days for antibiotic use, in liters/1000 patient-days for ABHR and in no/1000 patient-days for gloves, masks and gowns.

^b result of augmented Dickey Fuller test, if the variable was not stationary, an integration was used (Y= yes or N=no)

TABLE 2. Estimated multivariate time-series analysis model for monthly HA-MRSA incidence density ($R^2=0.604$)

Term	Time lag ^a	Coefficient (SE) ^b	<i>p</i>
Colonisation pressure of imported MRSA (days of MRSA/1000 patient-days)	0	0.0149 (0.003)	<0.001
Alcohol-based hand-rub use (L/1000 patient-days)	2	-0.0424 (0.004)	<0.001
	3	0.0127 (0.005)	0.006
Gloves use (number/1000 patient-days)	2	$3.61 \cdot 10^{-5}$ ($5.61 \cdot 10^{-6}$)	<0.001
	4	$1.32 \cdot 10^{-5}$ ($4.95 \cdot 10^{-6}$)	0.009
Gowns use (number/1000 patient-days)	1	-0.0017 (0.0004)	<0.001
	2	-0.0015 (0.0002)	<0.001
	4	0.0015 (0.0004)	<0.001
Penicillins use (DDD/1000 patient-days)	2	0.0012 (0.0004)	0.002
	3	-0.0027 (0.0004)	<0.001
Macrolides use (DDD/1000 patient-days)	3	0.0058 (0.0020)	0.005
Aminoglycosides use (DDD/1000 patient-days)	0	0.0069 (0.0026)	0.011
	1	0.0102 (0.0026)	<0.001
Quinolones use (DDD/1000 patient-days)	1	0.0019 (0.0008)	0.013
MA ^c	3	-0.9701 (0.0109)	<0.001

a : The delay necessary to observe the effect (in months).

b : The size and the direction of the effect.

c : Moving average term representing past disturbances in the incidence density of MRSA

TABLE 3. Main results of multivariate time-series analysis regarding the relationship between MRSA and infection control practices as well as antibiotic use in hospital settings.

Studies	Town/ Country	Size and type of hospital	Period	Mean MRSA incidence (/1000 PD)	Mean antibiotic use (DDD/1000 PD)	Mean ABHR ^a (L/1000 PD)	Positive association with MRSA ^b	Negative association with MRSA	R ²
Aldeyab <i>et al.</i> (2008) ⁶	Antrim, Northern Ireland	426 beds, General teaching	2000- 2004	0.9 ^c	598	1.7	FQs, 3 rd GC, macrolides and amoxiclav use, admission of MRSA patients	ABHR ^a orders, alcohol wipes, MRSA screening	0.78
Vernaz <i>et al.</i> (2008) ⁹	Geneva, Switzerland	2200 beds, Tertiary teaching	2000- 2006	1.5 ^c	330	13.0 to 20.1	FQs, 3 rd GC, macrolides and piperacillin/tazobacta in use	ABHR ^a campaigns	0.57
Kaier <i>et al.</i> (2009) ¹⁰	Freiburg, Germany	1600 beds, Tertiary teaching	2003- 2007	0.074 ^c	595	55.1 (46.2 to 60.3)	FQs, 2 nd and 3 rd GC and lincosamides use	monthly ABHR ^a orders	0.66
This study	Besançon, France	1200 beds, Tertiary teaching	2000- 2008	0.56 ^c	588	10.9 (2.9 to 22.1)	FQs, macrolides and aminoglycosides use, gloves use and MRSA colonization pressure	Monthly ABHR ^a orders Use of gowns Penicillins use	0.60

^a alcohol-based hand-rub

^b FQs: fluoroquinolones, 3rd GC: third generation cephalosporins.

^c Definition of MRSA incidence, (1) Aldeyab *et al.*: hospital-acquired MRSA (both colonization and infection, including screening) based on an delay of 48 h, (2) Vernaz *et al.*: clinical MRSA (excluding screening), (3) Kaier *et al.*: hospital-acquired MRSA infection based on an delay of 48 h, (4) this study: hospital-acquired MRSA (both colonization and infection, including screening) based on an delay of 48 h.

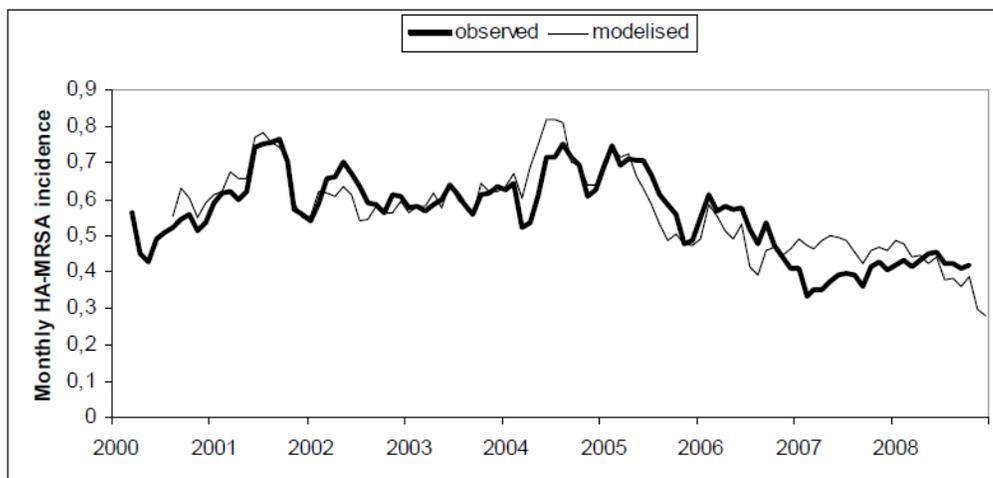


Figure 1: Monthly HA-MRSA incidence (per 1000 patient-days) observed versus modelised

4. Etude 4 – Modélisation multiniveau de la prévalence des patients infectés par *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de santé de l’Est de la France

4.1. Présentation de l’étude

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène majeur responsable d’IAS (3^{ème} rang selon l’enquête nationale de prévalence, ENP 2006). La question de la contribution respective des sources endogènes et exogènes à son épidémiologie reste controversée. Dans cette étude nous apportons un nouvel éclairage sur cette problématique.

Cette étude avait pour but de déterminer les facteurs individuels et collectifs associés à la prévalence des patients infectés par *P. aeruginosa* (cas) dans les établissements de santé (ES \geq 300 lits) de l’inter-région Est.

A partir des données de l’ENP 2006 pour l’inter-région Est, nous avons réalisé une analyse statistique utilisant des modèles de régression logistique multivariée multiniveau avec pour variable réponse la présence ou non d’une IAS à *P. aeruginosa* chez les patients hospitalisés. Ces modèles permettaient la prise en compte de la structure hiérarchique des données et l’investigation simultanée des facteurs associés à la prévalence à deux niveaux :

- niveau 1 (individuel/patient : l’âge, le sexe, le score de McCabe, le statut immunitaire, le type de service d’hospitalisation et les antécédents d’intervention chirurgicale récente) ;
- et niveau 2 (collectif/ES : la région, le type d’ES, le nombre de lits, les proportions de patients exposés à un dispositif invasif [sonde urinaire, cathéter vasculaire ou intubation/trachéotomie] ou sous traitement antibiotique).

Initialement, toutes les variables ont été testées en analyse univariée et ensuite un modèle final a été construit par introduction des variables avec un $p < 0,20$ selon une procédure pas à pas ascendante. La modélisation multiniveau a été réalisée par la construction de cinq modèles consécutifs. Un modèle inconditionnel (modèle 1, sans variable explicative, référence) permettant d’évaluer la répartition initiale de la variance de la variable réponse entre les deux niveaux : détermination du coefficient

de répartition de la variance ($VPC = \sigma_{u0}^2 / (\sigma_{u0}^2 + \pi^2/3)$, σ_{u0}^2 : variance de l'intercept aléatoire de niveau ES et $\pi=3,14159\dots$) qui correspond à la part de la variabilité totale expliquée au niveau des ES. Un modèle individuel (modèle 2) : introduction des variables de niveau patient, évaluation d'un effet aléatoire significatif de ces variables (effet variant d'un ES à un autre) et détermination du pourcentage de variation de la variance (PCV, variation de σ_{u0}^2 entre le modèle 1 et le modèle 2) qui représente ici la part de la variance de niveau ES (hétérogénéité des ES pour la variable réponse) expliquée par les variables du modèle 2 (variables de niveau patient). Dans les modèles 3a, 3b et 4 (modèles finaux), les variables de niveau ES sont introduites. Ces modèles différaient dans la façon dont les expositions aux dispositifs invasifs et aux traitements antibiotiques étaient prises en compte (proportions de patients exposés) : modèle 3a (≥ 1 dispositif invasif et ≥ 1 traitement antibiotique), modèle 3b (≥ 1 dispositif invasif, ≥ 1 antibiotique antipycyanique et ≥ 1 antibiotique non antipycyanique) et modèle 4 (chaque type de dispositifs invasifs et chaque classe d'antibiotiques pris séparément). Pour finir, les interactions inter-niveaux ont été testées.

4.2. Conclusion

Au total, 25533 patients issus de 51 ES (médiane = 376 patients ; extrêmes = 224-1964 patients) ont été inclus dans l'étude. La prévalence globale des cas était de 0,37% (médiane des ES = 0,25% ; extrêmes = 0-1,65%) correspondant à 94 cas pour 98 infections (dont 32% respiratoires, 32% urinaires et 15% peau/tissus mous ; 28% des souches de *P. aeruginosa* étaient résistantes à la ceftazidime). La modélisation multiniveau révélait que moins de 14% de la variabilité totale de la prévalence (VPC) était expliquée par des différences entre les ES. Après ajustement sur les variables de niveau patient qui expliquaient 52% de la variance de niveau ES (σ_{u0}^2), cette dernière devenait non significativement différente de zéro. Autrement dit, il n'y avait plus de différence significative entre les ES en ce qui concerne la variable réponse. En définitive, les paramètres associés significativement et positivement à la prévalence de cas étaient un score de McCabe ≥ 1 ($p < 0,001$), une hospitalisation en réanimation ($p < 0,001$), une intervention chirurgicale récente ($p < 0,01$), le sexe

masculin ($p < 0,05$) et des proportions élevées de patients exposés à au moins un dispositif invasif ($p < 0,05$) ou aux antibiotiques anti-pyocyaniques ($p < 0,01$), notamment les aminoglycosides ($p < 0,01$). Aucun effet aléatoire significatif de variable individuelle n'a été mis en évidence. En effet, en prenant l'exemple de la variable "hospitalisation en réanimation", son effet ne variait pas significativement d'un ES à un autre. La limite principale de notre étude est qu'elle reposait sur des données d'enquête transversale. Ces résultats devraient être confirmés par une étude multiniveau longitudinale.

En conclusion, un effet de composition (caractéristiques des patients), beaucoup plus qu'un effet contextuel (caractéristiques écologiques) explique la variabilité de la prévalence des patients infectés par *P. aeruginosa* dans les ES de l'inter-région Est.

4.3. Texte de l'article

GBAGUIDI-HAORE H, CHOLLEY P, RABAUD C, BERTRAND X, TALON D. Multilevel modelling of the prevalence of hospitalized patients infected with *Pseudomonas aeruginosa*. (soumis à *Epidemiology and Infection*, décembre 2009).

**Multilevel modelling of the prevalence of hospitalized patients infected with
*Pseudomonas aeruginosa***

H. GBAGUIDI-HAORE^{1,2,*}, P. CHOLLEY^{1,2}, C. RABAUD³, X. BERTRAND^{1,2} AND
D. TALON^{1,2,3}

¹Service d'Hygiène Hospitalière et d'Épidémiologie Moléculaire, Centre Hospitalier
Universitaire Besançon, France.

²UMR 6249 CNRS-Université de Franche-Comté, Besançon, France.

³CCLIN-Est, Nancy, France.

Running Title[‡]: **Multilevel modelling of *P. aeruginosa***

*Corresponding author: Dr H. Gbaguidi-Haore
Service d'Hygiène Hospitalière et d'Épidémiologie
Moléculaire
CHU Jean Minjoz, 3 boulevard Fleming
25030 Besançon, France
Tel: 333 81 66 82 86; Fax: 333 81 66 89 14
E-mail: z2gbaguidihaore@chu-besancon.fr

[‡] **Multilevel modelling of *P. aeruginosa***

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa (*Pa*) is one of the leading nosocomial pathogens. The question of the respective contribution of endogenous and exogenous sources remains controversial. In this study, we brought new light on this issue by means of a multilevel logistic regression analysis which allowed a simultaneous investigation of factors associated with prevalence of patients infected with *Pa* at two levels: patient and healthcare facility (HCF) in eastern of France. A total of 25533 inpatients from 51 HCFs were included in analysis. The overall prevalence was 0.37% (range, 0-1.65%). Multilevel modelling estimated that less than 14% of total variability of the outcome variable was explained by differences between HCFs and that after adjusting for patient-level variables which explained 52% of HCF-level variance, the latter became not significantly different of zero. A compositional effect (patient factors), rather than a contextual effect (ecological factors) explains heterogeneity of the prevalence of patients infected with *Pa* in eastern HCFs of France.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading pathogens responsible for healthcare-associated infections in hospitals worldwide [1]. In France, it was ranked third nosocomial pathogens according to the 2006 national nosocomial infections (NIs) prevalence survey [2]. Its intrinsic resistance to various antimicrobial agents,[3] as well as its ability to acquire additional resistance mechanisms [4], make often difficult the treatment of infections caused by this microorganism [5]. *P. aeruginosa* is known to be an ubiquitous environmental opportunistic pathogen with one side, an intermittent presence in the normal human intestinal flora and other side, an intestinal colonization among hospitalized patients upper to 10% [6, 7]. Several studies, mainly in intensive care units (ICUs) attempted to evaluate the respective contribution of endogenous *versus* exogenous sources of *P. aeruginosa* colonization or infection. This issue remains controversial. Indeed, some studies argued for a major role (more than 80%) of endogenous flora of the patient [8-10]. On the other hand, other authors have shown that exogenous sources (other patients and the inanimate environment such as taps and sinks) via cross-transmission played a substantial role (upper to 50%) in the acquisition of *P. aeruginosa* [11-14]. In the following study, we brought new light on this issue by means of a multilevel statistical approach (a patient nested within a hospital). The aim of this work was to determine individual (patient)- and group (hospital)-level factors associated with prevalence of hospitalized patients infected with *P. aeruginosa*.

MATERIAL AND METHODS

Setting, period of study and data source

Data were from the 2006 national NIs point prevalence survey for the eastern regions of France. These regions, at number of five (Alsace, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche-Comté and Lorraine) account for 8.5 millions of inhabitants corresponding to 14% of French population. This point prevalence survey was performed in 2006, a given day during the month of June by trained investigators. These last ones collected data regarding hospitalized patients and healthcare facilities (HCFs) by means of standardized questionnaires. The resulting database, for eastern regions of France included 52 720 inpatients and 343 HCFs (representing 83% of hospitals eligible for this survey). Our study was limited to HCFs of at least 300 beds.

Outcome variable

The outcome variable was binary and indicated whether a given hospitalized patient had, the day of survey a *P. aeruginosa* NI acquired during his hospitalization (>48 hours after admission, imported NIs [i.e. acquired in another hospital] were excluded). Definitions of NIs were adapted from those of CDC [15], and from those of McGeer *et al* [16] for patients from long-term care facilities. Asymptomatic bacteriurias were excluded. Regarding antibiotic resistance, only data about ceftazidime resistance were collected (resistant or not).

Data structure

Individual-level variables: patient characteristics.

At the patient level (the lowest level of data), the following characteristics were considered: age (converted in binary data; < or ≥ 65 years), sex (male/female), immunocompromized status (yes/no), McCabe score (0: non fatal disease/1: ultimately fatal disease/2: rapidly fatal disease) [17], surgery during the previous month (yes/no) and type of hospitalization ward (medical/surgical/intensive care unit /other).

Group-level variables: HCF/hospital characteristics.

Regarding the HCF level, this study included hereafter variables: region of location (Alsace/Bourgogne/Champagne-Ardenne/Franche-Comté/Lorraine), type (University /general/psychiatric/other), status (public/private) and no. of beds (< or ≥ 900 beds). Moreover, individual factors relating to an exposure, the day of survey to invasive devices (intravascular device, tracheal catheter and urinary catheter [within the 7 previous days]) and to antibiotic treatments were aggregated at HCF level. In fact, we considered that the measure of exposure was biased at patient level for these extrinsic factors. Indeed, data about this type of exposures were collected only for the day of survey (except for the urinary catheter) and nothing was recorded about the chronology of exposure in relation to infection. Thus, exposures to invasive devices were taken into account as proportions (%) of patients exposed to at least one invasive device, intravascular device, tracheal catheter and urinary catheter. Similarly, exposures to antibiotic agents were taken into account as proportions of patients exposed to antibiotic treatments, antipseudomonal antibiotics, non antipseudomonal antibiotics, penicillins, cephalosporins, aminoglycosides,

quinolones, macrolides and other classes of antibiotics. In addition, HCFs were divided into two categories using the median as cut point for each of proportions mentioned above. In this study, antipseudomonal antibiotics corresponded to the following drugs: ticarcillin ± clavulanic acid, piperacillin ± tazobactam, some third generation cephalosporins (ceftazidime, cefsulodine), all the fourth generation cephalosporins (cefepime, ceftipime...), aztreonam, carbapenems (imipenem and meropenem), aminoglycosides, ciprofloxacin and colistin.

Statistical analysis

To take into account the hierarchical structure of data, patient nested within HCF, and the possibility of intra-HCF correlation regarding the probability of being infected with *P. aeruginosa*, we used a two-level hierarchical logistic regression analysis. Initially, each independent variable was tested in a univariate analysis using Stata software, version 10 (Stata Corp., College Station, TX, USA), and subsequently a final model was built by introducing variables with $p < 0.20$ in the univariate analysis. The model building used a forward stepwise selection process. Five consecutive multilevel models were fitted to data. The model-1 (unconditional, baseline), that included only the constant (i.e. no explanatory variables) was assessed to determine the initial distribution of the variance of the dependant variable between the two levels: the variance partition coefficient was calculated using Snijders & Bosker approximation [18, 19] [$VPC = \sigma_{u0}^2 / (\sigma_{u0}^2 + \pi^2/3)$, σ_{u0}^2 : variance of the HCF-level random intercept and π : quantity 3.14159]. VPC is the proportion of total variance of the dependant variable explained at the HCF-level. In Model-2 (individual model), we entered patient-level variables and we assessed whether any of the coefficients of any of the explanatory variables had a significant variance component between

HCFs (heterogeneity of the effect across HCFs). In models 3a, 3b and 4 (final models) HCF-level variables were added. These final models differed by the way in which variables relating to invasive devices and antibiotic treatments were included: model-3a (on the whole, i.e. ≥ 1 invasive device and ≥ 1 antibiotic treatment), model-3b (≥ 1 invasive device, ≥ 1 antipseudomonal antibiotic and ≥ 1 non antipseudomonal antibiotic) and model-4 (each type of invasive devices and each class of antibiotics). Finally, we tested cross-level interactions (between patient- and HCF-level variables). The percentage of proportional change in variance (PCV) was calculated $[(\sigma_{u0}^2 (\text{model-2}) - \sigma_{u0}^2 (\text{model-1})) \times 100 / \sigma_{u0}^2 (\text{model-1})]$. PCV represented the percentage of HCF-level variance (heterogeneity of HCFs in terms of dependent variable) that was explained by variables retained in the model-2 (patient-level variables, in this case). Significance of parameters was assessed with Wald test. Modelling was performed using MLwiN software, version 2.02 [20]. A p -value < 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Overall prevalence

From database source, 51 HCFs (≥ 300 beds) were included in the study corresponding to 26 249 inpatients. Because of missing values, only 25 533 inpatients (97.3%) were retained for analysis with a median number of patients per HCF equal to 376 (range, 224-1964). The overall prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* was 0.37% (95% confidence interval, 0.30-0.45) with a median prevalence in HCFs equal to 0.25% (range, 0-1.65). Prevalence was nil in 35% of HCFs. Overall, 94 patients were infected during their hospitalization for a total of 98 infections (28% of isolates were ceftazidime-resistant). Main sites of infection were respiratory tract (32%), urinary tract (32%) and skin/soft tissues (15%).

Univariate analyses, patients and healthcare facilities characteristics

In table 1, we reported characteristics of patients depending on whether they were infected or not with *P. aeruginosa*. As regards HCFs, these were mainly general hospitals, which admitted almost half of patients, with a public status and with <900 beds (table 2). Other HCFs' characteristics including patients' data aggregated relating to invasive devices and antibiotic treatments were gathered in table 2. Univariate analyses revealed on the one hand, that age of patient, region where was located HCF, as well as its status and high proportions (\geq median) of patients exposed to quinolones were not significantly associated with prevalence of cases. On the other hand, infected patients were significantly (table 3) more often men, with an immunocompromized status, a McCabe score ≥ 1 , a previous surgery, hospitalized in ICU, in a university hospital, of at least 900 beds with high proportions of patients

exposed to invasive devices (intravascular device, tracheal catheter and urinary catheter) and antibiotic agents (all classes except quinolones).

Multilevel modelling

Results of multilevel modelling are presented in table 4. Firstly, the model-1 (no explanatory variables, i.e. with only random intercept) revealed a significant heterogeneity of HCFs in term of prevalence of cases (σ_{u0}^2 , HCF-level variance was significantly different of zero). VPC was equal to 14% and represented the initial share of total variance (heterogeneity) of outcome variable attributable to HCF level. Secondly, after adjusting for patient-level variables (model-2, individual model), HCF-level variance decreased and became not significantly different of zero, i.e. there was not any more significant heterogeneity between HCFs. PCV was equal to 52% $[(0.533-0.258) \times 100/0.533]$. In other terms, patient-level variables retained in the model-2 explained 52% of HCF-level variance. Moreover, VPC was equal to 7.3% in the adjusted model for patient-level variables. No significant random effect was detected regarding patient-level variables, i.e. effects (coefficients) of these variables did not significantly vary across HCFs. Thirdly, the three final models showed that on the one hand the following patient-level variables were independently and positively associated with prevalence of cases: male sex ($p<0.05$), McCabe score ≥ 1 ($p<0.001$), a previous surgery ($p<0.01$) and a hospitalization in ICU ($p<0.001$). On the other hand, HCFs with high proportions of patients exposed to invasive devices (model-3a, $p<0.05$), antipseudomonal antibiotics (model-3b, $p<0.01$) and aminoglycosides (model-4, $p<0.01$) were positively associated with outcome variable. Finally, the model-building process led to random intercept and fixed coefficients models (finals models). No significant cross-level interaction was identified.

DISCUSSION

In this study, we tried by means of a complex statistical approach to bring new light on the issue of the share of patient- and ecological-level factors associated with *P. aeruginosa* infections. Thus, we used a multilevel modelling in order to quantify higher-level variations (at HCF level), some of which could be explained by the heterogeneity of the effect of patient-level factors (across HCFs) and HCF-level factors. This statistical approach makes possible a simultaneous and appropriate analysis of patient- and HCF-level characteristics [21]. Indeed, the implementation of multilevel logistic regression models had the following advantages: the correction of underestimation of standard errors (due to clustered data), the examination of cross-level interactions, the estimation of the variability of coefficients at the HCF level and the determination of distribution of total variance of outcome variable between patient and HCF levels. The unconditional model (model-1) showed that 14% (VPC) of variability of the outcome variable were explained by differences between HCFs. After adjusting for patient-level variables (model-2), VPC was equal to 7.3% and residual variance (HCF-level variance) decreased and became not significantly different of zero. This is an indication of a substantial compositional effect explaining heterogeneity of the prevalence of cases in HCFs eastern of France. Moreover, at the patient level, factors significantly associated with prevalence of cases were consistent with those reported in previous studies [1, 22]. Furthermore, in full model-3a, the proportion of patients exposed to “invasive devices” was positively associated with the outcome variable after adjusting for patient factors (control for ecological bias). That can be interpreted as a significant association between the level of invasive procedures of the hospital and prevalence of cases. Similarly, proportions of patients exposed to “antipseudomonal antibiotics” (model-3b) especially

“aminoglycosides” (model-4) were positively associated with the outcome variable. These findings can be explained by the fact that HCFs with higher prevalence of *P. aeruginosa* use more often antipseudomonal antibiotics. Another possible interpretation is that these HCFs are probably those with higher prevalence of multidrug-resistant strains. This hypothesis is sustained by the significant and positive association ($p=0.021$) between a high prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* ceftazidime-resistant and a high proportion of patients exposed to ceftazidime in HCFs. In this case, these variables regarding antibiotic exposure are an estimation of antibiotic selective pressure which provides to *P. aeruginosa* a selective growth advantage. Several individual-level studies demonstrated a significant and positive association between exposure to some antipseudomonal agents especially aminoglycosides and acquisition of *P. aeruginosa* [9, 23-25]. In our study, this association involving aggregated data at the HCF level could be simply the reflection of the association identified at the patient level. The present study has several limitations. Firstly, data are from a cross-sectional study (point prevalence survey). Thus, some findings, more particularly the major role of compositional effect on the heterogeneity of HCFs for *P. aeruginosa* infections should be confirmed using multilevel longitudinal studies. In addition, the outcome variable concerned the infection, and not the acquisition (colonization and/or infection) of *P. aeruginosa*. Secondly, available data did not allow us to determine the intermediate level between the patient level and the HCF level, i.e. a middle level such as the unit of hospitalization. The latter, would make possible to better comprehend and model the patient close environment (other patients, healthcare workers and inanimate hospital environment). Only the type of hospitalization ward was known and the variable “hospitalization in ICU” which characterizes a diagnostic as well as this middle level

was collapsed to patient level. However, no significant random effect at HCF-level was identified with this factor. In other terms, the coefficient of the variable “hospitalization in ICU” did not significantly vary across HCFs (33 out of 51 HCFs had at least one ICU). Thirdly, some individual variables were not taken into account or were included as aggregated data for reasons previously mentioned. This work was limited to HCFs with at least 300 beds. This restriction was motivated by findings from Moineddin *et al* [26] who recommend in case of low prevalence events (<10%) at least 50 groups and a group size (i.e. no. of individuals per group) adjusted such that the expected number of events in each group should be greater than one. In our study, we tried to comply with this recommendation. To our knowledge, this is the first study which investigates, at two levels (patient and HCF) factors associated with *P. aeruginosa* infection by means of a multilevel statistical approach.

In conclusion, multilevel analysis results suggest that a compositional effect (patient factors) rather than a contextual effect (ecological factors) explain the heterogeneity of the prevalence of patients infected with *P. aeruginosa* in HCFs of the Eastern regions of France. This finding is in line with studies that plead for a major role of endogenous flora in *P. aeruginosa* infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the French hospitals that contributed to data collection and the nosocomial infections surveillance network of eastern regions of France (CCLIN-Est [Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Est de la France]).

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Morrison AJ, Jr., Wenzel RP.** Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases* 1984;**6 Suppl 3**:S627-642
2. **Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN).** Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006. Saint-Maurice (France): Institut de veille sanitaire, 2009
3. **Mesaros N, et al.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infections* 2007;**13**:560-578
4. **Strateva T, Yordanov D.** *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2009;**58**:1133-1148
5. **Vettoretti L, et al.** Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2009;**28**:1217-1222
6. **Murthy SK, et al.** Oropharyngeal and fecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in hospital patients. *Journal of Clinical Microbiology* 1989;**27**:35-40
7. **Blanc DS, Francioli P and Zanetti G.** Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units - A Review. *Open Microbiology Journal* 2007;**1**:8-11
8. **Berthelot P, et al.** Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Medicine* 2001;**27**:503-512

9. **Bonten MJ, et al.** Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999;**160**:1212-1219
10. **Speijer H, et al.** Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;**37**:3654-3661
11. **Bergmans DC, et al.** Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 1998;**53**:1053-1058
12. **Bertrand X, et al.** Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Medicine* 2001;**27**:1263-1268
13. **Blanc DS, et al.** Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Medicine* 2004;**30**:1964-1968
14. **Reuter S, et al.** Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Critical Care Medicine* 2002;**30**:2222-2228
15. **Garner JS, et al.** CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American Journal of Infection Control* 1988;**16**:128-140
16. **McGeer A, et al.** Definitions of infection for surveillance in long-term care facilities. *American Journal of Infection Control* 1991;**19**:1-7
17. **McCabe WR, Jackson GG.** Gram-negative bacteremia I. Etiology and ecology. *Archives of Internal Medicine* 1962;**110**:847-855
18. **Goldstein H.** Multilevel Statistical Models. 3rd ed. London: E Arnold 2003

19. **Snijders T, Bosker R.** Multilevel analysis: an introduction to basic and advanced multilevel modelling. London: Sage, 1999
20. **Rasbash J, et al.** MLwiN Version 2.02. Bristol, UK: Centre for Multilevel Modelling, University of Bristol, 2005
21. **Diez Roux AV, Aiello AE.** Multilevel analysis of infectious diseases. *Journal of Infectious Diseases* 2005;**191 Suppl 1**:S25-33
22. **Cross AS.** Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *European Journal of Clinical Microbiology* 1985;**4**:156-159
23. **Martinez JA, et al.** Influence of antipseudomonal agents on *Pseudomonas aeruginosa* colonization and acquisition of resistance in critically ill medical patients. *Intensive Care Medicine* 2009;**35**:439-447
24. **Aloush V, et al.** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006;**50**:43-48
25. **Fortaleza CM, et al.** Risk factors for recovery of imipenem- or ceftazidime-resistant *pseudomonas aeruginosa* among patients admitted to a teaching hospital in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2006;**27**:901-906
26. **Moineddin R, Matheson FI and Glazier RH.** A simulation study of sample size for multilevel logistic regression models. *BMC Medical Research Methodology* 2007;**7**:34

Table 1. Characteristics^a of patients with and without *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) infection

Characteristic	No. (%) of patients	
	With <i>Pa</i> infection, n = 94	Without <i>Pa</i> infection, n = 25 439
Age ≥ 65 years	56 (59.6)	13 806 (54.3)
Mean [standard deviation]	66.2 [18.9]	61.6 [24.9]
Median [interquartile range]	73.8 [54-80]	68 [45-82]
Male sex	59 (62.8)	11 535 (45.3)
Immunocompromized status	18 (19.2)	2587 (10.2)
McCabe score		
- 0: non fatal disease	25 (26.6)	17 179 (67.5)
- 1: ultimately fatal disease	30 (31.9)	6037 (23.7)
- 2: rapidly fatal disease	39 (41.5)	2223 (8.8)
Previous surgery (within one month)	35 (37.2)	4499 (17.7)
Type of hospitalization ward		
- Medical	34 (36.2)	8723 (34.3)
- Surgical	17 (18.1)	5552 (21.8)
- ICU ^b	23 (24.4)	564 (2.2)
- Other ^c	20 (21.3)	10 600 (41.7)

^a $P < 0.05$ for all patients characteristics except age.

^b ICU: intensive care unit.

^c Other: rehabilitation, long term-care and psychiatry

Table 2. Characteristics of healthcare facilities (HCFs \geq 300 beds): HCF-level factors

Characteristic	No. of hospitals (%), n=51	No. of patients (%), n=25 533	
Region of location			
- Alsace	10 (19.6)	6303 (24.7)	
- Bourgogne	12 (23.5)	4687 (18.3)	
- Champagne-Ardenne	8 (15.7)	4306 (16.9)	
- Franche-Comté	8 (15.7)	4075 (16.0)	
- Lorraine	13 (25.5)	6162 (24.1)	
Type of hospital			
- University	7 (13.7)	7665 (30.0)	
- General	29 (56.9)	12 280 (48.1)	
- Psychiatric	10 (19.6)	3941 (15.4)	
- Other	5 (9.8)	1647 (6.5)	
Status			
- Public	45 (88.2)	23 281 (91.2)	
- Private	6 (11.8)	2252 (8.8)	
No. of beds			
- <900 beds	43 (84.3)	16 575 (64.9)	
- \geq 900 beds	8 (15.7)	8958 (35.1)	
Proportion ^a (%) of patients exposed to	Minimum	Median (IQR ^b)	Maximum
- Invasive devices	0	30.0 (19.2-39.2)	50.0
• Intravascular device	0	24.6 (16.7-33.4)	43.9
• Tracheal catheter	0	1.2 (0-2.5)	5.4
• Urinary catheter	0	10.2 (5.5-12.8)	18.5
- Antibiotic treatments	0.6	17.0 (11.1-21.5)	34.1
• Antipseudomonal antibiotics	0	2.7 (0.7-4.5)	8.3
• Non antipseudomonal antibiotics	0.6	15.3 (10.7-19.5)	32.3
• Penicillins	0.2	7.9 (4.9-10.2)	17.2
• Cephalosporins	0	3.1 (1.6-5.0)	10.2
• Aminoglycosides	0	0.9 (0-1.7)	3.5
• Quinolones	0	5.0 (2.9-6.4)	10.8
• Macrolides	0	1.2 (0.6-1.8)	3.7
• Others	0	2.7 (1.5-4.4)	10.2

^a Proportion (%) of patients exposed the day of survey to at least one invasive device (intravascular device, tracheal catheter or urinary catheter [within seven previous days])/at least one antibiotic treatment.

^b IQR: interquartile range.

Table 3. Univariate analyses of patient- and healthcare facility (HCF)-level factors associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection

Characteristic	OR ^a [95% CI ^b]	<i>p</i>
Patient level		
Age ≥ 65 years	1.23 [0.71-2.11]	0.368
Male sex	2.02 [1.29-3.15]	0.002
Immunocompromized status	1.88 [1.09-3.27]	0.024
McCabe score		
- 0: non fatal disease	Reference	-
- 1: ultimately fatal disease	3.34 [1.90-5.88]	<0.001
- 2: rapidly fatal disease	11.79 [6.89-20.17]	<0.001
Previous surgery (within one month)	2.47 [1.57-3.87]	<0.001
Hospitalization in ICU ^c	12.76 [7.65-21.28]	<0.001
HCF level		
Region of location		
- Alsace	Reference	-
- Bourgogne	1.56 [0.55-4.45]	0.402
- Champagne-Ardenne	2.02 [0.68-5.97]	0.205
- Franche-Comté	1.94 [0.66-5.70]	0.225
- Lorraine	1.01 [0.35-2.96]	1.0
Type of hospital		
- University	Reference	-
- General	0.70 [0.38-1.30]	0.258
- Psychiatric	0.14 [0.04-0.54]	0.004
- Other	0.11 [0.01-0.98]	0.048
Status		
- Public	Reference	-
- Private	0.24 [0.05-1.29]	0.096
No. of beds		
- <900 beds	Reference	-
- ≥900 beds	2.07 [1.03-4.13]	0.041
Proportion (%) of patients exposed to ^d		
- Invasive devices	3.89 [1.92-7.89]	<0.001
• Intravascular device	3.10 [1.59-6.03]	<0.001
• Tracheal catheter	3.66 [1.80-7.46]	<0.001
• Urinary catheter	2.52 [1.30-4.89]	0.006
- Antibiotic treatments	3.15 [1.58-6.27]	0.001
• Antipseudomonal antibiotics	4.16 [2.10-8.22]	<0.001
• Non antipseudomonal antibiotics	3.15 [1.59-6.22]	0.001
• Penicillins	2.66 [1.41-5.04]	0.003
• Cephalosporins	3.00 [1.56-5.79]	0.001
• Aminoglycosides	4.57 [2.34-8.92]	<0.001
• Quinolones	1.45 [0.74-2.85]	0.278
• Macrolides	2.69 [1.40-5.18]	0.003
• Others	2.42 [1.24-4.72]	0.010

^aOR: odds ratio.

^bCI: confidence interval.

^cICU: intensive care unit.

^d odds ratio are reported for proportions upper than median.

Tables 4. Multilevel logistic regression models of patient and healthcare facility (HCF) characteristics associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection (adjusted odds ratio [OR] and 95% confidence interval [CI])^a

Parameter	Model-1 ^b OR [95% CI]	Model-2 ^b OR [95% CI]	Model-3a ^b OR [95% CI]	Model-3b ^b OR [95% CI]	Model-4 ^b OR [95% CI]
Fixed part					
Intercept (SE ^c)	-5.96 (0.17)***	-7.26 (0.27)***	-7.77 (0.38)***	-7.83 (0.37)***	-7.91 (0.37)***
Patient level					
Male sex		1.66 [1.07-2.60]*	1.65 [1.06-2.56]*	1.65 [1.07-2.56]*	1.68 [1.08-2.60]*
McCabe score		Reference	Reference	Reference	Reference
- 0: non fatal disease		3.23 [1.84-5.66]***	3.08 [1.76-5.37]***	3.04 [1.75-5.28]***	2.98 [1.72-5.16]***
- 1: ultimately fatal disease		9.54 [5.52-16.48]***	8.87 [5.16-15.27]***	8.71 [5.08-14.92]***	8.69 [5.08-14.84]***
- 2: rapidly fatal disease		2.18 [1.37-3.48]**	2.04 [1.29-3.23]**	2.03 [1.29-3.21]**	2.01 [1.27-3.18]**
Previous surgery (within one month)		5.82 [3.35-10.09]***	5.49 [3.19-9.45]***	5.61 [3.27-9.61]***	5.72 [3.34-9.79]***
Hospitalization in ICU ^d					
HCF level					
Proportion (%) of patients exposed to					
- Invasive devices			2.30 [1.13-4.68]*	2.59 [1.30-5.15]**	2.92 [1.49-5.75]**
- Antipseudomonal antibiotics					
- Aminoglycosides					
Random part					
σ_{u0}^2 : HCF-level variance (SE)	0.533 (0.264)*	0.258 (0.178) ^{NS}	0.204 (0.157) ^{NS}	0.143 (0.133) ^{NS}	0.117 (0.123) ^{NS}
VPC ^e	14%	7.3%	5.8%	4.2%	3.4%
PCV ^f	/	52%	62%	73%	78%

^aNS: non significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; p values are from Wald χ^2 test.

^bThe model-building strategy used a forward stepwise selection process of patient- and HCF-level factors. Model-1 (unconditional model); without covariates, baseline. Model-2 (individual model); includes only patient-level variables. Three final models: model-3a (includes invasive devices and antibiotic treatments on the whole), model-3b (includes invasive devices on the whole and antipseudomonal/non antipseudomonal antibiotics) and model-4 (includes separately each type of invasive devices [intravascular device, tracheal catheter, urinary catheter] and each class of antibiotics [penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, quinolones, macrolides and others]).

^cSE: standard error.

^dICU: intensive care unit.

^eVPC: variance partition coefficient (%), [calculated using Snijders & Bosker approximation, $\sigma_{u0}^2 / (\sigma_{u0}^2 + \pi^2/3)$].

^fPCV: proportional change in variance (%), $[(\sigma_{u0}^2(\text{model-2}) - \sigma_{u0}^2(\text{model-1})) / \sigma_{u0}^2(\text{model-1})] \times 100$, for the model-2 in this case.

5. Etude 5 – Epidémiologie moléculaire de *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant dans un hôpital universitaire

5.1. Présentation de l'étude

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'incidence de *P. aeruginosa* multi-résistant (MDR-PA) au CHU de Besançon et de déterminer son épidémiologie moléculaire.

Pour cela une étude prospective a été menée d'octobre 2007 à septembre 2008. Tous les isolats de prélèvements à visée diagnostique et de dépistage ont été collectés, à l'exception de ceux des patients atteints de mucoviscidose. Les prélèvements de dépistage ne concernaient que les services de réanimation adulte (dépistage à l'admission puis une fois par semaine ; nez, rectum et aspiration trachéale). L'antibio-résistance de ces isolats a été évaluée contre 13 molécules antipyocyaniques (ticarcilline, ticarcilline/acide clavulanique, pipéracilline/tazobactam, aztréonam, ceftazidime, céfépime, imipénème, méropénème, ciprofloxacine, gentamicine, tobramycine, amikacine et colistine). Les souches multi-résistantes sans doublon (c.-à.-d, résistantes ou intermédiaires à l'ensemble des molécules antipyocyaniques testées ; la sensibilité à une seule d'entre elles et/ou à la colistine était autorisée) ont été analysées davantage. Ces analyses incluaient la détection phénotypique de BLSE (test de synergie), l'identification des gènes *bla* codant pour les BLSE (PCR + séquençage) et le génotypage (PFGE, *Dral*).

5.2. Conclusion

Trente-huit patients (5,8% des patients positifs à *P. aeruginosa*) étaient colonisés et/ou infectés par MDR-PA au cours de la période d'étude, soit un taux d'incidence de 0,1/1000 patient-jours (prélèvements de dépistage exclus). Deux d'entre eux étaient positifs à l'admission (≤ 48 heures). Sur les 36 autres, 13 étaient d'emblée positifs à MDR-PA et 23 ont été d'abord positifs à une souche moins résistante. La détection de BLSE et l'identification des gènes *bla* étaient négatives. Deux isolats produisaient une oxacillinase acquise (OXA-14 et OXA-28) et les 36 autres étaient considérés comme hyperproducteurs d'AmpC. Les 38 isolats ont donné 12

pulsotypes, dont un incluait 15 isolats (clone épidémique majeur ; D) et trois incluait quatre isolats chacun (clones micro-épidémiques ; A, G et J). Le génotypage montrait que la transmission croisée était possiblement responsable d'environ 70% des MDR-PA. Ces clones étaient déjà présents dans notre établissement chez des souches moins résistantes et l'analyse spatio-temporelle ne permettait pas dans la majorité des cas d'identifier des cas groupés. Finalement, ces résultats suggèrent que les clones MDR-PA émergent principalement, à la faveur de la pression de sélection antibiotique parmi des clones de *P. aeruginosa* endémiques moins résistants qui diffusent largement au sein de notre hôpital par transmission croisée. La priorité devrait être donnée à l'amélioration de l'observance des précautions "standard".

5.3. Texte de l'article

CHOLLEY P, GBAGUIDI-HAORE H, BERTRAND X, THOUVEREZ M, HOCQUET D, PLESIAT P, TALON D. Molecular epidemiology of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Journal of Hospital Infection*, 2010, sous presse.

Molecular epidemiology of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital

Pascal Cholley^{1,2}, Houssein Gbaguidi-Haore^{1,2}, Xavier Bertrand^{1,2,3}, Michelle Thouverez^{1,2}, Didier Hocquet^{3,4}, Patrick Plésiat^{3,4}, Daniel Talon^{1,2,3}

¹Service d'Hygiène Hospitalière Centre Hospitalier Universitaire Besançon, ²UMR 6249 Chrono-environnement, Université de Franche-Comté, ³Centre National de Référence-Résistance chez *P. aeruginosa*, Centre Hospitalier Universitaire Besançon, ⁴Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire Besançon,

Corresponding author:

Daniel Talon, Service d'Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire Besançon.

3 Bd Fleming, 25030 Besançon, Cedex, France.

Tel: (33) 3 81669053.

Fax: (33) 3 81668914.

E-mail: daniel.talon@univ-fcomte.fr

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, genotyping, multi-drug resistant, epidemiology

Summary

The aim of this study was to assess the incidence of multi-drug resistant *P. aeruginosa* in the different departments of our university hospital and to determine their molecular epidemiology. Analysis included antimicrobial susceptibility profiling, *bla* gene identification and pulsed-field gel electrophoresis. During the one-year study, six hundred and fifty four patients had at least one sample positive with *P.aeruginosa* and 38 (5.8%) were colonised or infected with a multi-drug resistant isolate giving an incidence of 0.1 patient per 1000 patient-days. Two isolates produced one acquired extended-spectrum β -lactamase (OXA-14 and OXA-28). The 38 non-duplicate isolates yielded twelve different PFGE patterns, of which three patterns including isolates from four patients and one pattern including isolates from 15 patients. Genotyping showed that cross-transmission is responsible for approximately 70% of multi-drug resistant *P. aeruginosa* cases. The major epidemic and the 3 main microepidemic clones were already present in our hospital with a more susceptible phenotype and the spatio-temporal analysis failed in most of the cases to find an evidence of cross-transmission. It is likely that some *P. aeruginosa* clones are endemic in our hospital and that, within these clones multi-drug resistant isolates emerge under antibiotic pressure. Our results indicate that cross-transmission plays a major role in the spread of multi-drug resistant *P. aeruginosa* and suggests that priority have to be given to improvement of standard hygiene procedures.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading causes of bacteraemia and pneumonia in patients hospitalised in intensive care units (ICUs).¹ French national point prevalence survey revealed that this micro-organism was responsible for 18 % of nosocomial infections in ICUs, and 6 % in medical and surgical departments.² Environmental sources of *P. aeruginosa* (e.g. contaminated equipment) have been identified in a large number of outbreaks³. The true importance of *P. aeruginosa* in the hospital environment as it relates to hospital-acquired infections remains a controversial issue.³ In addition to being intrinsically resistant to several antimicrobial agents, *P. aeruginosa* can acquire resistance to conventional anti-pseudomonal antibiotics including anti-pseudomonal penicillins, ceftazidime, carbapenems, aminoglycosides and fluoroquinolones.⁴ Over recent years, *P. aeruginosa* isolates resistant to all standard anti-pseudomonal antibiotics available for clinical use and causing nosocomial infections and outbreaks have been reported.⁵⁻⁷ Multi-drug resistance in *P. aeruginosa* makes treatment of infections both difficult and expensive and can increase morbidity and mortality.⁴ The objective of this study was to assess the incidence of multi-drug resistant *P. aeruginosa* (MDR-PA) in the different departments of our university hospital and to determine their molecular epidemiology.

Material and methods

Setting and study design

Besançon Hospital is a French university-affiliated hospital with 1200 acute-care beds. Data were collected prospectively from October 2007 to September 2008. All *P. aeruginosa* clinical and screening isolates, except cystic fibrosis isolates, were collected and tested for antimicrobial resistance against 13 antipseudomonals (ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, aztreonam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin and colistin). Screening samples (nose, rectum and tracheal aspiration) were only collected in adult ICUs on admission and once a week thereafter. Resistance patterns of all the *P. aeruginosa* strains were determined by the Kirby-Bauer disk method on Mueller-Hinton agar (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France), as recommended by the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology⁸. A Sirscan automated image analyzer (I2A, Perols, France) was used to precisely measure inhibition diameters and to compile resistance data.⁹ Multi-drug resistant *P. aeruginosa* (i.e. resistant or intermediate to all anti-pseudomonals tested or susceptible to only 1 antipseudomonal antibiotic with the exception of colistin) were further selected.

Bacterial identification and resistance mechanism determination

Diagnostic or screening samples were streaked on Columbia agar supplemented with 5% horse blood or on Mueller-Hinton agar (Biorad, Ivry-sur-Seine, France), respectively. Identification of *P. aeruginosa* was based on positive oxidase activity, resistance to kanamycin, growth at 41°C and not at 4°C and confirmed by biochemical tests (ID32GN, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). A ESBL phenotypic screening test was performed for all ceftazidime resistant isolates by using the double disk synergy test (DDST) where disks of

ceftazidime, aztreonam and cefepime (30 µg each) were positioned at variable distance from a disk containing amoxicillin (20 µg) and clavulanate (10 µg).¹⁰

bla gene identification

Whole-cell DNA suitable for PCR experiments was extracted and purified with the QiAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtabœuf, France). The β-lactamase-encoding genes *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}, *bla*_{BEL}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{OXA-I} group, *bla*_{OXA-II} group, *bla*_{OXA-III} group, *bla*_{OXA-9} and *bla*_{OXA-18} were amplified by PCR from the DNA extracts of studied isolates with specific primers.¹¹ PCR positive controls with adequate strains were systematically run in parallel. Purified amplicons were sequenced on both strands using the dye-terminator chemistry on an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The nucleotide sequences were compared and aligned with reference sequences using NCBI BLAST program.

Genotyping

The macrorestriction (using *DraI*) profile of total DNA from each isolate was determined by pulsed-field gel electrophoresis (CHEF DRIII, Bio-Rad), according to a method previously developed in our laboratory.¹² We used the GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to establish a DNA similarity matrix. A dendrogram was constructed using the unweighted-pair-group method of the arithmetic average clustering method with the Dice coefficient. We ensured that the gels were comparable by including *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 as a reference. PFGE results were interpreted according to international recommendations.¹³ PFGE patterns were considered as sporadic if recovered from a single patient, micro-epidemic if recovered from 2 to 5 patients and epidemic if recovered from more than 5 patients.

Results

During the study period, 60,454 patients were admitted for a total 328,782 patient-days. Six hundred and fifty four patients had at least one sample positive with *P.aeruginosa* and 38 patients (5.8%) were colonised and /or infected with a multi-drug resistant isolate. Table I reports the incidences of multi-drug resistant *P. aeruginosa* according to specialties. These incidences were calculated excluding screening isolates. The distribution of the sites of isolation according to the type of unit is shown in Table II.

Only 2 of the 38 patients were positive for MDR-PA on admission, considering a cut-off of 48 hours after admission. The mean delay of acquisition of MDR-PA for the 36 remaining patients was 41 days (IC 95, 27.86-54.70). Thirteen of these 36 patients were initially colonised with a MDR-PA. The 23 others were initially colonised with a more susceptible isolate.

Among the 38 non-duplicate MDR-PA isolates, 6 were resistant to all anti-pseudomonals tested (excluding colistin), 16 were non susceptible (resistant or intermediate susceptible) to all anti-pseudomonals tested and 10 remained susceptible to one anti-pseudomonal (tobramycin, 4; amikacin, 2; gentamicin, 1; aztreonam, 1; imipenem, 1 and ciprofloxacin 1). Two isolates produced one acquired extended-spectrum oxacillinase (OXA-14 and OXA-28). The 36 other isolates were considered as AmpC overproducers, in absence of *bla* gene identification by PCR experiments and negative DDST test.

The 38 non-duplicate isolates yielded twelve different PFGE patterns (A to L): six unique patterns, one pattern including isolates from two patients, one pattern including isolates from three patients, three patterns including isolates from four patients and one pattern including isolates from 15 patients (Figure 1). The distribution of the patients colonised with the epidemic and the main micro-epidemic PFGE patterns according to the units of hospitalisation is shown in Table III. Figure 2 shows spatio-temporal distribution of patients

colonized or infected with epidemic clone D. The epidemic PFGE pattern and the 3 patterns including isolates from four patients were included in our *P. aeruginosa* PFGE database. All these 4 patterns were shared by non-multi-drug resistant isolates genotyped before this study. Extended-spectrum oxacillinase OXA-14 was produced by the isolate of the sporadic clone H (patient no. 13) and OXA-28 by one of the 2 isolates of micro-epidemic clone H (patient no. 31).

Discussion

The incidence of MDR-PA acquired colonization/infections (0.1/1000 patient-days) in our hospital is not as high as that observed for other MDR bacteria such as MRSA (0.275/1000 patient-days) and ESBL producing *Enterobacteriaceae* (0.263/1000 patient-days) during the same period. However the incidence of MDR-PA is not negligible considering our drastic definition of multi-drug resistance, chosen from a clinical perspective. Indeed, MDR-PA isolates were in the best case susceptible to one antipseudomonal, colistin excepted. The available choices of antimicrobial therapy for the treatment of MDR-PA infections are at this time rather narrow. Considering the variability in MDR definition¹⁴, the comparison of incidences between studies is quite impossible.

In our study, the contribution of screening samples of ICU patients in identification of the global snapshot of MDR among *P. aeruginosa* isolates is important. In ICUs where a screening program is implemented, 5 out of 11 patients with MDR-PA were only detected with screening samples. Although high compliance with hand hygiene disinfection procedures should be sufficient to prevent cross-transmission, screening appears as an important measure when a health care facility is confronted with outbreaks of MDR-PA^{12,15,16}.

Spatio-temporal distribution of MDR-PA isolates in our hospital demonstrated that all type of specialities (ICU, medicine, haematology, surgery), with the exception of paediatrics, are concerned with these isolates. Genotyping showed that one major epidemic clone was represented by 40% of the MDR-PA isolates. Taking into consideration that micro-epidemic clones accounted for 30 % of MDR-PA isolates, clonal outbreaks involving cross-transmission are responsible for approximately 70% of MDR-PA cases. Nevertheless, two observations are of interest. Firstly, the major epidemic and the 3 main microepidemic clones were already present with a more susceptible phenotype in our hospital before the study. Secondly, the spatio-temporal analysis failed in most of the cases to find an evidence of cross-

transmission of clonal isolates (Fig 2). As MDR-PA strains were detected in different units over a long period, these strains probably endemically spread in our hospital. Our results also show that MDR-PA strains may sporadically acquire or lose resistance determinants during the course of an outbreak. Endemic clones therefore circulate in our hospital and MDR isolates emerge under antibiotic pressure.

Given the possible life-threatening consequences of *P. aeruginosa* infection and the continued emergence of MDR strains which hamper effective antimicrobial therapy, it is clear that strategies to reduce the likelihood of antimicrobial resistance become a key issue. Our results indicate that cross-transmission plays a major role in the spread of MDR-PA in our hospital and suggests that priority have to be given to improvement of standard hygiene procedures, particularly hand disinfection after washing, before and after contact with patients. Wise use of antibiotics is also essential.

Acknowledgements: None.

Conflict of interest: None to declare

Funding sources: This work was funded by grants from the French Ministry of Health in the framework of a clinical research programme 2007.

References

1. Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* 1992;**29 Suppl A**:19-24.
2. Institut national de veille sanitaire. *Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales 2006*. Paris: InVS;2007.
3. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009;**73**:338-344.
4. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;**34**:634-640.
5. Deplano A, Denis O, Poirel L, *et al*. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2005;**43**:1198-1204.
6. Vettoretti L, Floret N, Hocquet D, *et al*. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;**28**:1217-1222.
7. Hsueh PR, Tseng SP, Teng LJ, Ho SW. Pan-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infection at a university hospital in Taiwan. *Clin Microbiol Infect* 2005;**11**:670-673.
8. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Rapport 2007*. Paris: Société Française de Microbiologie; 2007.
9. Medeiros AA, Crellin J. Evaluation of the Sirscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:1688-1693.
10. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:2990-2995.

11. Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B, Mariotte P, Talon D, Bertrand X. Nationwide investigation of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Antimicrob Agents Chemother* in press.
12. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, *et al.* Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001;**27**:1263-1268.
13. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;**33**:2233-2239.
14. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2006;**55**:1619-1629.
15. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, *et al.* Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 2001;**27**:503-512.
16. Koss WG, Khalili TM, Lemus JF, Chelly MM, Margulies DR, Shabot MM. Nosocomial pneumonia is not prevented by protective contact isolation in the surgical intensive care unit. *Am Surg* 2001;**67**:1140-1144.

Table I. Incidence of multi-drug resistant *P. aeruginosa* isolates according to the hospital speciality, Besançon university hospital.

Type of unit	Number of patients with clinical specimen positive with <i>P. aeruginosa</i>	Incidence per 100 patients [CI95%]	Incidence density per 1000 patients-days [CI95%]
Surgery	10	0.036 [0.018-0.069]	0,076 [0.039-0.145]
Haematology	3	0.227 [0.058-0.721]	0.233 [0.060-0.741]
Medicine	14	0.057 [0.032-0.098]	0.095 [0.054-0.164]
Paediatrics	0	0	0
ICU	6 (11)*	0.705 [0.286-1.609]	0.618 [0.251-1.420]
Total	33 (38)*	0.054 [0.038-0.077]	0.100 [0.070-0.143]

* Numbers in brackets indicate the total number of isolates including screening isolates. These isolates were excluded for calculation of incidences

Table II. Distribution of the sites of MDR-PA isolation according to the type of unit

Site of isolation		ICU	Medicine	Haematology	Surgery	Total
Clinical samples	Blood	2	0	0	0	2
	Urine	0	6	0	3	9
	Intra-abdominal	2	0	1	1	4
	Vascular Catheter	1	1	0	0	2
	Wound	1	2	1	5	9
	Pulmonary	0	5	1	1	7
Screening samples	Rectum or tracheal aspiration	5	-	-	-	5
Total		11	14	3	10	38

Table III: Distribution of main PFGE patterns

PFGE pattern no	A	D	G	J
Number of patients	4	15	4	4
Number of units	4	12	4	3
Isolation period	Oct 07-Aug 08	Oct 07-Aug 08	Oct 07-Jun 08	Nov 07- Mar 08

Figure 1. Pulsed-field gel electrophoresis banding patterns after *Dra*I digestion of non-duplicate *P. aeruginosa* isolates.

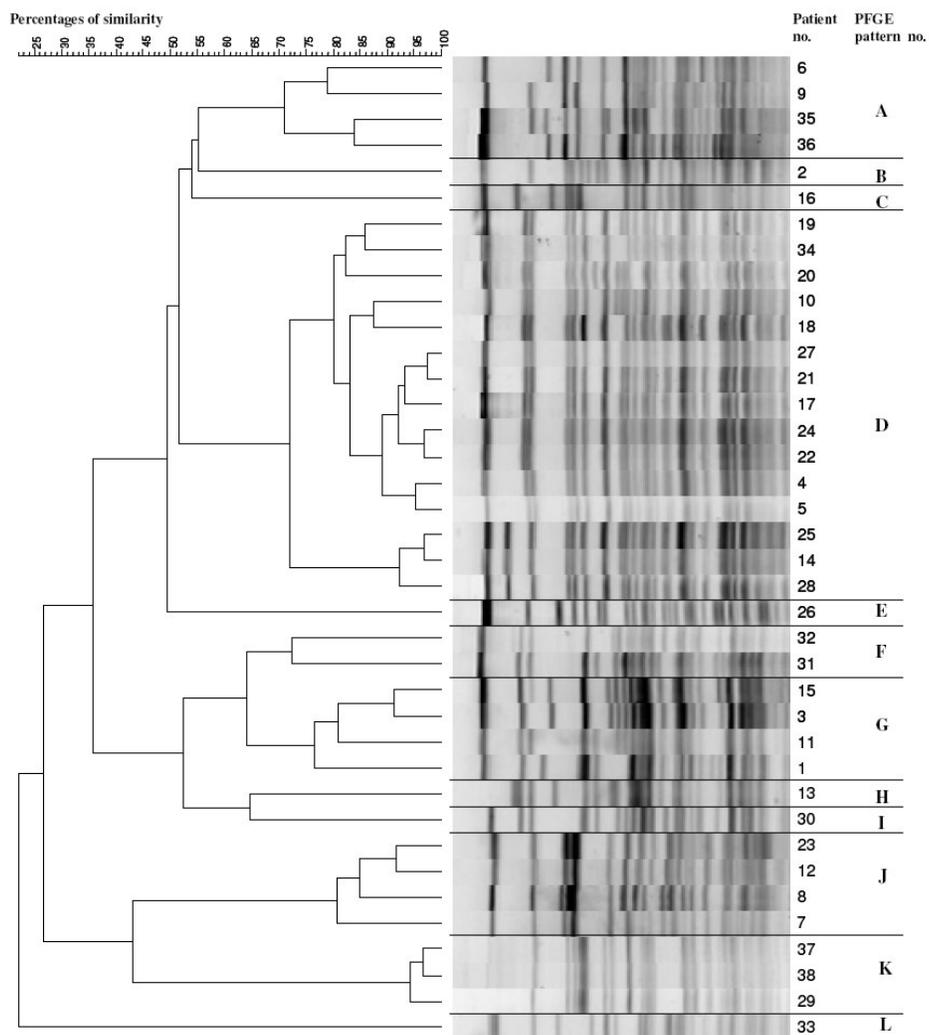
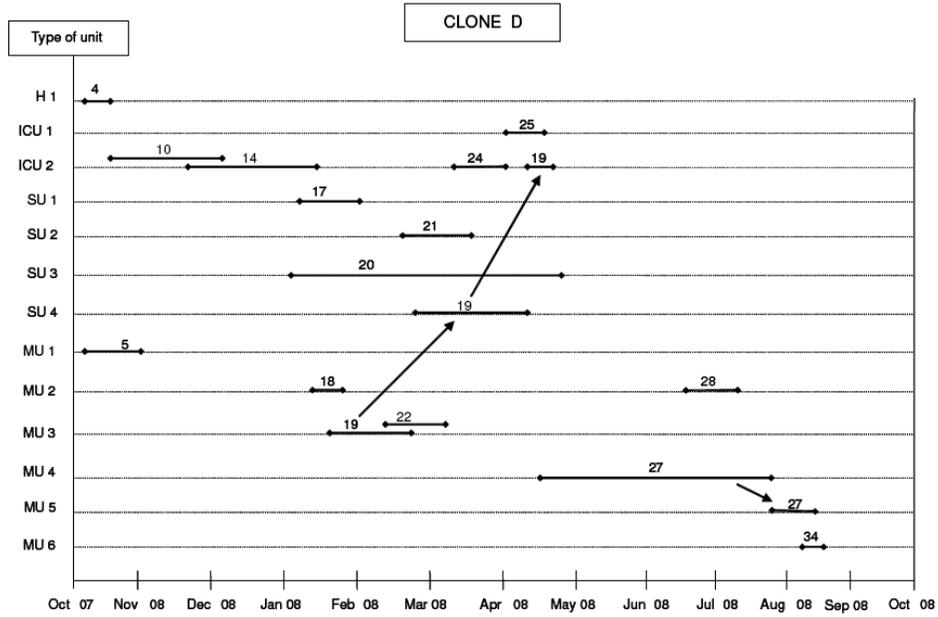


Figure 2: Spatio-temporal distribution of PFGE pattern D.



H: haematology unit, MU: medical unit, SU: surgical unit, ICU: intensive care unit.
 Numbers indicate patient no., solid line indicates the stay of the patient, arrow indicates the transfer of the patient between units.

6. Etude 6 – Epidémiologie moléculaire d'*Escherichia coli* producteur de β -lactamase à spectre étendu dans l'inter-région Est

6.1. Présentation de l'étude

Dans le but de caractériser l'émergence de *E. coli* producteur de BLSE dans l'inter-région Est, une étude épidémiologique multicentrique a été menée sur la période 2006-2008.

Durant le 2^{ème} trimestre de chaque année (2006 à 2008), toutes les souches de *E. coli* BLSE (sans doublon) isolées de prélèvements à visée diagnostique ont été collectées dans les hôpitaux participants. Ces souches ont été caractérisées en ce qui concerne le type de gènes *bla*, le groupe phylogénétique et par l'analyse PFGE (une souche *E. coli* TN03 [O25 : H4-ST131] était utilisée comme référence). Par ailleurs, des données cliniques étaient recueillies.

Pour information, notre contribution spécifique à ce travail, coordonné par le CHU de Reims concernait la détermination du groupe phylogénétique et le génotypage par PFGE de l'ensemble des souches collectées.

L'analyse des souches et des données collectées en 2007 et 2008 est en voie de finalisation. Nous présentons donc dans le cadre de cette thèse les résultats de l'année 2006.

6.2. Conclusion

Au total, 87 souches de *E. coli* BLSE ont été collectées provenant de 24 hôpitaux (dont cinq hôpitaux universitaires et un établissement privé) et correspondant à un taux d'incidence global de 0,05/1000 patient-jours. La BLSE la plus fréquente était de type CTX-M (84%) et majoritairement CTX-M-15 (49%). Les proportions des souches appartenant aux groupes phylogénétiques A, B1, B2 et D étaient de 51, 2, 35 et 12%, respectivement. Le génotypage des 79 souches typables donnait 49 pulsotypes, dont un pulsotype majeur (clone I) qui rassemblait 22 souches (28%) et auquel appartenait la souche O25 : H4-ST131, de groupe phylogénétique B2 et

possédant une BLSE de type CTX-M-15 principalement (n=19). Ce clone était retrouvé dans les cinq régions de l'inter-région Est.

Finalement, ces premiers résultats révèlent la large diffusion dans l'Est de la France du clone intercontinental O25 : H4-ST131. Le contrôle de la diffusion de ce clone virulent et multi-résistant constitue un défi majeur des années à venir.

6.3. Texte du rapport

**Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum
 β -lactamase in East Inter-Region of France in 2006**

V. Duval ⁽¹⁾, O. Bajolet ⁽¹⁾, H. Gbaguidi-Haore ⁽²⁾, E. Siebor ⁽³⁾, Guillard T ⁽¹⁾, L. Brasme ⁽¹⁾,
J. Madoux ⁽¹⁾, V. Vernet-Garnier ⁽¹⁾, H. Tronel ⁽⁴⁾, D. Talon ⁽²⁾, C. Neuwirth ⁽³⁾,
X. Bertrand ⁽²⁾, C. de Champs ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ CHU de Reims, UFR Médecine Université Reims Champagne-Ardenne Laboratoire de
Bactériologie – Virologie – Hygiène 51092 Reims, France.

⁽²⁾ Laboratoire d'Hygiène, CHU de Besançon

⁽³⁾ Laboratoire de Bactériologie, CHU de Dijon

⁽⁴⁾ C.Clin-Est, CHU de Nancy

^a Corresponding author : Laboratoire de Bactériologie Virologie Hygiène Centre Hospitalier
Universitaire de Reims, avenue général Koenig, 51092 Reims cedex. France. Tel : 33 326 787
702 Fax : 33 326 784 134 E-mail : cdechamps@chu-reims.fr

Short title: Extended-Spectrum beta-lactamase *E.coli* in Eastern France.

Synopsis

Objectives: To assess the enzymes, phylogenetic group, clonal diversity and incidence of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs)-producing *E. coli* in eastern France in 2006.

Methods: During the second quarter of 2006, all the non-duplicate isolates of ESBLs producing *E. coli* (n=87), screening samples excluded, were collected in 5 teaching-, 18 public hospitals and 1 private clinic. *bla* genes were sequenced, the phylogenetic group was determined, and genotyping was performed by pulsed field gel electrophoresis.

Results: The most frequent ESBLs were CTX-M-type (n=73; 84 %) predominantly CTX-M-15 (n=43; 49 %). The others were CTX-M-1, -2, -3, -14 and 32. The other ESBLs were TEM-(n=11) and SHV-type (n=3). One new TEM-type enzyme was identified. Twenty-four isolates (28 %) were susceptible to fluoroquinolones and 57 (66%) to aminoglycosides. The distribution into phylogenetic groups was 51, 2, 35, and 12% in groups A, B1, B2 and D respectively. Seventy-nine pulsed typed isolates were distributed into 49 pulsotypes. One major cluster I (n=22) of phylogenetic group B2 was identical to the strain 025-H4 ST131 and produced CTX-M-15 (n=19) or CTX-M-14 (n=3). The incidence density per 1000 patient-days was 0.05 for ESBL producing *E. coli* and 0.02 for cluster I.

Conclusion: Despite the long experience of French hospital staff in the management of ESBL producing *Enterobacteriaceae*, the clonal *E. coli* 025-H4-ST131 spread within hospitals of the eastern France. This raises the question of implementing further control measures to stop this spread.

Key- words: extended spectrum β -lactamase, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, phylogenetic group, multidrug resistance.

Introduction

In the 1990s, extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) related to TEM and SHV-type enzymes were widely observed, mostly in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. However, since 2002, the occurrence of CTX-M-type enzymes has modified the epidemiology of ESBL- producing Enterobacteriaceae and the increase in the proportion of ESBL producing *Escherichia coli* is of growing concern^{1, 2, 3}. A survey was conducted from April to June 2006 to evaluate the frequency and the diversity of ESBL producing *E. coli* in the East of France.

Materials and methods

Administratively, eastern France (8.3 million inhabitants) comprises five administrative regions: Alsace, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche Comté and Lorraine. Methicillino-resistant *Staphylococcus aureus* and ESBL- producing Enterobacteriaceae incidence surveys are annually performed by the C.Clin-Est (East Inter-regional Infection control coordinating centre) during the second quarter, and data on hospital activities are collected (number of hospitalisation days). In 2006 an additional survey was introduced to characterize the non-duplicate isolates of ESBL producing *E. coli*, screening samples excluded. Antibiotic susceptibility testing was performed with the disk diffusion method on Mueller Hinton agar at 37°C for 18H according to the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology guidelines (CA-SFM)⁴ and six different phenotypes were defined according to the resistance to non beta-lactams antibiotics (Table 1). ESBL production was detected by the double-disk synergy test and with disks containing 30 μ g of

cefotaxime and ceftazidime alone and in combination with 10 µg of clavulanate (CDO2 and CDO3, Oxoid SA 69571 Dardilly France). Isoelectric focusing (IEF) was carried out for all the isolates¹. Genes *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*OXA et *bla*VEB were detected by PCR using specific primers as previously described¹. Sequence analysis was performed by Genome Express (38944 Meylan, France) and analysed with DNA sequencing Analysis Software. Isolates were genotyped by determination of their macrorestriction pattern of total DNA (pulsotype) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (CHEF DRIII, Bio-Rad Ivry sur Seine, France) using *Xba*I (Boehringer Mannheim, Germany) as previously described⁵. We used the Gel Compar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to establish a DNA similarity matrix based on the Dice coefficient (2 x 2 strain comparisons). A dendrogram was constructed using the unweighted-pair-group method of arithmetic averages clustering method with the Dice coefficient. We ensured that the gels were comparable by including *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 and the *E. coli* strain TN03 (025:H4 ST131) as references, and results were interpreted according to international recommendations⁶. Phylogenetic grouping of *E. coli* isolates was performed by a previously published method⁷. An isolate was considered as community acquired when: (i) it was isolated from an outpatient or during the 2 first days after admission, (ii) when the patient had not been admitted to a hospital during the previous year (iii) when the patient did not live with a health care worker or with a patient who had been hospitalized in the previous 6 months. Infection was defined in accordance with Centers for Disease Control and Prevention criteria⁸.

Results

During this survey, 87 isolates of ESBL producing *E. coli* were collected in 24 hospitals (5 teaching- 18 public hospitals and 1 private clinic). They were isolated from urine (n=63; 72%), blood cultures (n=7; 8%), catheters (n=1; 1%) and other 98 origins (n=16; 19%). There

were 30 male patients and 57 female with a median age of 76.4 years (range 0-94 years). They were admitted to medical (n=50; 57%) surgical (n=11; 13%), emergency (n=1; 1%), intensive care units (n=10; 11%) and long-term-care facilities (n=15; 17%). In 71 patients (82%), the ESBL producing *E. coli* was isolated for the first time. Twenty-eight isolates (32%) were considered as community acquired. The median hospital stay before isolation was 19.5 days (range 3-1609) for hospital acquired strains. In 52 patients (60%) isolates were responsible for infection, in 35 for colonization (40%). Eight patients died during the month following isolation of the ESBL producing *E. coli*. No death was attributable to the ESBL producing *E. coli* infection. The proportion of CTX-M type enzymes was 84% (n=73). The other ESBLs were TEM- (12%; n=11) and SHV-type (3%; n=3). Seven different enzymes were observed among the CTX-M-type enzymes of which the most frequent was CTX-M-15 (n=43; 49%). The other CTX-M-type enzymes were CTX-M-1 (n=17), CTX-M-14 (n=9), CTX-M-3 (n=2), CTX-M-2 (n=1) and CTX-M-32 (n=1). TEM type enzymes were TEM-52 (n=5) and TEM-24 (n=5) and one previously unreported TEM, which differed from TEM-1 by a S238G substitution. SHV-type enzymes were SHV-2 (n=1) and SHV-12 (n=2). Twenty-four (28%) isolates were susceptible to fluoroquinolones and 47 (54%) to aminoglycosides (Table 1). Four (5%) were resistant to both aminoglycosides and fluoroquinolones. Aminoglycoside resistance (31/43, 72% vs 3/30, 10%; $p = 10^{-6}$) and fluoroquinolone resistance (39/43, 91% vs 14/30, 47%; $p = 3.10^{-5}$) was more frequent in CTX-M-15 than in other CTX-M producing strains.

Eighty four isolates were available for molecular typing. Of these, 43 were in phylogenetic group A (51%), 2 in B1 (2%), 29 in B2 (35%), 10 in D (12%). Isolates from blood cultures belonged to group A (n=6) and B2 (n=1). PFGE analysis revealed that the 79 typed isolates (5 were untypeable) were distributed into 49 pulsotypes: 1 major epidemic cluster I (n= 22), 5

micro-epidemic clusters, II (n=4), III (n=3), IV (n=3), V (n=2) and VI (n=2), and 43 sporadic clusters (including one single isolate). All cluster I isolates were in phylogenetic group B2 and the PFGE profile was identical to that of strain 025-H4:ST131³ (Table 2). Most of them produced CTX-M-15 but three produced CTX-M-14, which is unusual in France. Cluster I was observed in all five regions. In 18/22 (82%) cases, isolates were considered as hospital acquired, and 20/22 (91%) patients had no previously known ESBL-producing strain. In 15/22 cases (68%) isolates were responsible for an infection. Of the CTX-M-15 producing isolates 19/43 (44%) belonged to cluster I: the others were in cluster IV (n=3) and V (n=1), and 46.5% (n=16) were sporadic. Cluster I isolates were highly resistant to aminoglycosides (15/22, 68%) and to fluoroquinolones (22/22, 100%). Incidence densities per 1000 patient-days were 0.04 for CTX-M-15 producing *E. coli* and 0.02 for cluster I.

Discussion

The increase in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* observed in numerous countries is mainly due to the spread of CTX-M producing *E. coli*. Incidence density per 1000 patient-days in the regions of eastern France showed an increase from 0.04 in 2004 to 0.08 in 2006 for ESBL producing *Enterobacteriaceae* and from 0.02 to 0.05 for ESBL producing *E. coli* isolates. The enzymes involved vary according to the countries, but CTX-M-15 has currently been shown to be the most frequent^{1,3,9,10}.

In our study the proportion of CTX-M-type enzymes was similar to that observed in 2004 in the Champagne-Ardenne region (82.5%) but higher than in southern France (58%). The proportion of CTX-M-15 was higher than in 2004 (33%)^{1,2}. Appreciable progress in the understanding of this epidemic was achieved by the identification of the clonal epidemic strain *E. coli* 025:H4 ST131^{3,9,10}. However, little is known about the prevalence of this strain, especially over a wide area. In France *E. coli* 025:H4-ST131 isolates were mainly reported in

association with CTX-M-15 but rarely with other enzymes such as CTX-M-1 or CTX-M-14, and grouped in a same cluster, by PFGE genotyping, except in the report of Lau et al. This cluster represented about 22% of ESBL producing *E. coli* in Spain vs 28% in our study^{3, 9, 10}. The prevalence of the multiresistant virulent cluster I in five contiguous regions and its hospital-acquired character is of concern. The fact that for 82% patients it was the first isolate contrasts with the quite long delay before hospital acquisition and illustrates the difficulties encountered in controlling the spread of these strains. Consideration should now be given to the implementation of additional measures such as patient cohorting to control cluster I isolates.

Acknowledgments:

Groupe BMR du C.Clin-Est, Laboratoires Région Est.

Professor Guillaume Arlet (Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, France) for providing the strain TN03 (*E. coli* 025:H4 ST 131)

East region laboratories

Centre Hospitalier d'Auxerre, S. Honore-Bauakline

Centre Hospitalier de Beaune, A. Rousset

Hôpitaux Civils de Colmar, D. De Briel, E. Parisi-Duchêne

Centre Hospitalier Le Creusot, S. Davidian

CHG Louis Pasteur de Dole, N. Petitboulanger

Centre Hospitalier du Val de Saône Gray, Z. Berkane

Hôpital Belle Isle de Metz, D. Cael – M.C. Moulhade

CHR Bon secours de Metz, J.L. Jurin

HIA Legouest Metz, P. Bisserie

Centre Hospitalier de Mulhouse, J.M. Delarbre
CHU de Nancy, A. Lozniewski, N. Aissa
Centre Hospitalier de Reithel, F. Gerometta
Centre Hospitalier Louis Faillon de Saint Claude, F. Mermet-Jeanvoine
Centre Hospitalier Saint Dié des Vosges, G. Michel
CHG de Sélestat, C. Lemble
Syndicat Interhospitalier de l'agglomération de Schlitigheim, M. Szulc
Centre Paul Strauss de Strasbourg, B. Pottecher
CHU de Strasbourg, F. Jehl, J.M. Scheftel, Y. Piemont
Groupe Hospitalier St Vincent de Strasbourg, B. Pottecher
Clinique Sainte Odile de Strasbourg, S. Weber
Centre Hospitalier de Troyes, C. Eloy

Funding

This work was supported by inter-regional grants from Ministère de la Santé et des Solidarités France (Projet Hospitalier de Recherche Clinique PHRC2005-R11-06 and PHRC2006/IR11-02/ 137IR06).

Transparency declarations

None to declare

References

1. Brasme L, Nordmann P, Fidel F *et al.* Incidence of class A extended-spectrum beta-lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 956–64.
2. Lavigne JP, Marchandin H, Delmas J *et al.* CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J Clin Microbiol*, 2007; **45**: 620–6.
3. Clermont O, Lavollay M, Vimont S *et al.* The CTX-M-15 producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1024–8.
4. Recommandations du Comité de l'Antibiogramme communiqué 2009 <http://www.sfm.asso.fr> (15 April 2009, date last accessed).
5. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M *et al.* Discrimination power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp Infect* 1996; **32**:135–45.
6. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2233–9.
7. Clermont O, Bonacorsi S, and Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiol* 2000; **66**:4555–8.
8. Garner JS. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988 ; **16**: 128–140.
9. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM *et al.* UK epidemic *Escherichia coli* 228 strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST1231 clone. *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**: 1241–4.

10. Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2009 in press.

Table 1 : distribution of the different non- β -lactams resistance phenotypes

Phenotype	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Ciprofloxacin	N (%)
1	S	S	S	S	23 (26)
2	S	S	S	R	24 (28)
3	S	R	R	R	19 (22)
4	R	R	S	R	16 (18)
5	S	R	R	S	1 (1)
6	R	R	R	R	4 (5)

N : number of isolates

Table 2 : Epidemiological and bacterial characteristics of the *E. coli* strains.

PFGE	Number of isolates	Region ^{a,b}	Specimen type ^{b,c}	Resistance phenotypes ^{b,d}	Phylogenetic ^b group	ESBL ^b	
I	22	A(10) B(2) CA(3)	U(20) other (2)	2(7) 3(9) 4(5)	B2(22)	CTX-M-15 (19)	
		FC(4) L(3)		6(1)		CTX-M-14 (3)	
II	4	CA(2) L(2)	U(2) B(1) others (1)	2(4)	A(2)	CTX-M-1 (1)	
					B1(1) B2(1)	CTX-M-3 (1)	
							SHV-12 (1) TEM-52 (1)
III	3	B(1) CA(1) FC(1)	U(2) others (1)	1(3)	A (3)	CTX-M-1 (3)	
IV	3	A (3)	U (3)	1(1) 3(1) 4(1)	A (3)	CTX-M-15 (3)	
V	2	B(1) L(1)	U (1) others (1)	2(1) 3(1)	A (2)	CTX-M-1 (1)	
Sporadic	43	A (15) B (8) CA (5)	U (28) B (5) others (10)	1(18) 2(10) 3(5) 4(7) 5(1) 6(2)	A (29) B1 (1) B2 (6) D (7)	CTX-M-1 (10) CTX-M-15 (16) CTX-M-14 (5) other CTX-M (3) SHV type (2) TEM-type (7)	
		FC (5) L (10)					
Untypeable	5	A (3), B(1), FC (1)	U (2), B (1), others (2)	2(1) 3(3) 4(1)	A (4), D (1)	CTX-M-1 (1), CTX-M-15 (2) other CTX-M (1), TEM-type (1)	

^a Regions : A : Alsace, B : Bourgogne, CA : Champagne Ardenne, FC : Franche Comte, L : Lorraine.

^b Isolates number are bracketted

^c Specimen : U : urine, B : Blood.

^d Resistance phenotypes are defined in Table I

7. Autre étude – Epidémiologie moléculaire d'*Enterobacter cloacae* dans un service de néonatalogie : un programme de surveillance de deux ans

Cette dernière étude se situe à la périphérie de la thématique de cette thèse dans le sens où les souches impliquées sont majoritairement de phénotype sensible. Toutefois, elle aborde la problématique de l'émergence de *E. cloacae* en tant que pathogène majeur chez les patients hospitalisés, notamment en néonatalogie.

7.1. Présentation de l'étude

Dans cette étude, nous rapportons les résultats d'un programme de surveillance de *E. cloacae* dans le service de néonatalogie du CHU de Besançon et nous décrivons son épidémiologie moléculaire, notamment par l'investigation de la transmission mère-enfant.

Ce programme de surveillance a été mis en place à la suite d'une épidémie dramatique causée par cette bactérie en décembre 2002 ; avec trois bactériémies à *E. cloacae* dont une a conduit au décès d'un enfant. La gestion de l'épidémie incluait une surveillance active impliquant un dépistage du portage intestinal de *E. cloacae* (écouvillonnage rectal) chez les nouveau-nés admis dans les deux unités constituant le service de néonatalogie (unité des prématurés et réanimation néonatale). Cette surveillance a été menée jusqu'en décembre 2004. En parallèle au dépistage des nouveau-nés, un dépistage des mères dont les enfants étaient transférés en néonatalogie était effectué au cours de l'année 2004. Toutes les souches (prélèvements à visée diagnostique et dépistage [une souche par patient]) ont été typées par l'analyse PFGE (*Xba*I), la détermination des profils de résistance n'était effectuée que pour les souches issues de prélèvements à visée diagnostique.

7.2. Conclusion

Au cours de la période d'étude, 166 (22,6%) des 735 enfants inclus ont eu une colonisation intestinale à *E. cloacae*, 29 enfants (3,9%) ont présenté un ou plusieurs prélèvements à visée diagnostique positifs (n=33). La majorité des souches avaient

un phénotype sensible ; aucune des souches ne produisaient de BLSE, 6 sur 33 souches étaient hyperproductrices de céphalosporinase et toutes les souches étaient sensibles aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones. La transmission mère-enfant a été identifiée comme responsable de seulement 8,8% du portage de cette bactérie chez les enfants, la transmission croisée était impliquée dans 41,2% de cette acquisition et 50% du portage était d'origine inconnue. Toutefois, le rôle de la transmission croisée a été probablement sous-estimé puisque seule une souche de dépistage par patient était typée. L'absence de données cliniques (procédures invasives, traitements antibiotiques...) constituait la principale limite de notre étude. Finalement, ce programme de surveillance révèle une contribution majeure de la transmission croisée et un rôle mineur de la transmission mère-enfant dans la diffusion de *E. cloacae* dans le service de néonatalogie. Cette étude souligne l'importance de la bonne observance des pratiques d'hygiène par le personnel soignant.

7.3. Texte de l'article

GBAGUIDI-HAORE H, TALON D, THOUVEREZ M, MENGET A, BERTRAND X. Molecular epidemiology of *Enterobacter cloacae* in a neonatal department: a 2-year surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008, 27, p. 643-648.

Molecular epidemiology of *Enterobacter cloacae* in a neonatal department: a 2-year surveillance study

H. Gbaguidi-Haore · D. Talon · M. Thouverez ·
A. Menget · X. Bertrand

Received: 7 August 2007 / Accepted: 1 February 2008 / Published online: 5 March 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract A surveillance program was implemented to investigate the molecular epidemiology of *Enterobacter cloacae* in neonatal units. This program ran for 2 years and involved screening for *E. cloacae* intestinal colonization of all infants at admission and weekly thereafter. In addition, mothers whose children were admitted to neonatal units were also screened. Pulsed-field gel electrophoresis analysis was used to establish genetic relationships between strains and to identify mother-to-child transmission. During the survey period, 166 (22.6%) of the 735 included children had *E. cloacae* intestinal colonization, and 29 (3.9%) patients gave clinical samples positive for *E. cloacae*. Genotyping revealed 90 different pulsotypes in the 199 clinical and screening isolates from neonates, including three major epidemic clones. Mother-to-child transmission of *E. cloacae* was directly responsible for 8.8% of intestinal colonization of the neonates. This surveillance program reveals a major contribution of patient-to-patient transmission and the rarity of mother-to-child transmission in the spread of *E. cloacae* in neonates. This highlights the

importance of good compliance with infection control procedures by health-care workers.

Introduction

Enterobacter cloacae is a saprophytic gram-negative bacilli of the normal flora of the human intestinal tract. However, over the last 20 years it has become an important opportunistic pathogen in hospitalized patients, notably neonates [1, 2]. The gastrointestinal tract of newborns is initially “sterile” and is rapidly colonized in the hospital setting by strains present in their nearby environment. This colonization is often the source of endogenous infections, especially in debilitated patients previously under antibiotic treatment [3, 4]. Outbreaks of *E. cloacae* are frequent and may be associated with the identification of a single common exogenous source, such as contaminated intravenous solution, blood products, or cross-transmission (CT) via health-care workers’ hands or medical devices [5–9]. However, most hospital-acquired *E. cloacae* infections occur following endogenous carriage [2, 10].

In December 2002, three infants hospitalized in our neonatal department had *E. cloacae* bloodstream infections, and one resulted in the death of an infant. Management of this outbreak included reinforcement of hygiene measures, implementation of strict cohorting and restriction of admission [11]. A surveillance program involving screening for *E. cloacae* intestinal colonization and genotyping was initiated in December 2002 and continued until December 2004.

Here, we report the results of this surveillance program and describe the molecular epidemiology of *E. cloacae* in our neonatal department. We also investigated whether mother-to-child transmission (MTCT) was a possible source of *E. cloacae* colonization.

H. Gbaguidi-Haore · D. Talon · M. Thouverez · X. Bertrand
Service d’Hygiène Hospitalière et d’Epidémiologie moléculaire,
Centre Hospitalier Universitaire Besançon,
Besançon cedex, France

A. Menget
Service de Néonatalogie,
Centre Hospitalier Universitaire Besançon,
Besançon cedex, France

X. Bertrand (✉)
CHU Jean Minjoz,
25030 Besançon cedex, France
e-mail: xavier.bertrand@univ-fcomte.fr

Patients and methods

Setting and study period

Besançon Hospital is a 1,220-bed university-affiliated public hospital. The neonatal department is a 30-bed unit. The department consists of two units: a 14-bed pediatric intensive care unit (PICU) and a 16-bed premature unit (PU). Premature neonates with severe organ failure are transferred to the PICU for life-support treatment and return to the PU or other facilities when their condition stabilizes. Our neonatal department became the regional reference center in 1999, and an increasing number of premature neonates have been admitted since. The majority of children are born in our hospital and come from the gynecology-obstetric department. This study included all children admitted to one of the two neonatal units from the beginning of December 2002 to the end of December 2004.

Description of the surveillance program

The surveillance program included screening for *E. cloacae* intestinal colonization (rectal swab) on admission to the neonatal department and once a week thereafter. It also included collection of *E. cloacae* isolates recovered from clinical samples in case of suspicion of sepsis. In 2004, mothers of children who were born in our hospital and admitted to the neonatal department were screened for *E. cloacae* intestinal carriage. A report detailing the results of weekly screening and positive clinical samples was communicated to the units concerned to remind them of the importance of rigorous compliance with hygiene measures. After the outbreak phase (December 2002 to the end of 2003, disappearance of major epidemic clones), only standard precautions were recommended to manage *E. cloacae* carriers. Each month, the infection control department released a report on the evolution of *E. cloacae* colonization and infection in the neonatal units.

Microbiology

Rectal swabs were inoculated into brain-heart broth (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) supplemented with 20 mg/l amoxicillin and 10 mg/l clavulanic acid. These cultures were incubated at 37°C for 24 h. All positive broth cultures were subcultured on Drigalski agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 20 mg/l cephalothin and incubated at 37°C for 24 h. Colonies morphologically resembling *Enterobacteriaceae* were primarily identified by gram staining and a negative oxidase test. *E. cloacae* were identified by the API 20 E system analysis (API 20E Strips, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Strains in clinical samples were identified

to species level by standard methods confirmed by biochemical characteristic analysis.

Antibiotic susceptibility was determined (only clinical isolates) by the disk diffusion method, and the results were interpreted according to the guidelines of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology [12]. All *E. cloacae* isolates showing reduced susceptibility or resistance to ceftazidime (<22 mm for a 30-μg disk) and/or cefotaxime (<27 mm for a 30-μg disk) and/or aztreonam (<27 mm for a 30-μg disk) were also tested for extended-spectrum β-lactamase (ESBL) production by a double-disk diffusion test [12]. According to the results of antibiograms and ESBL production test, isolates were classified as being wild type (WT: resistant to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and cephalothin), high-level β-lactamase producers (HLBL: resistant or intermediate to ceftazidime and/or cefotaxime and without ESBL production) or ESBL producers.

Genotyping

E. cloacae clinical isolates and the first rectal screening isolate from each patient were typed. Moreover, for five children, randomly selected, all screening isolates were typed. In addition, five different colonies of *E. cloacae* from the first positive screening sample were also typed to assess clonal diversity of acquired strains. In brief, a method previously developed in our laboratory was used for macro-restriction analysis of total DNA using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [13]. DNA was digested with *Xba*I, and fragments were separated in a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). We used the GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) to establish a DNA similarity matrix. A dendrogram was constructed using the unweighted-pair-group method of arithmetic averages clustering method with the Dice coefficient. We ensured that the gels were comparable by including *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 DNA as a reference. Isolates differing by ≤6 bands were considered to belong to the same clones and isolates differing by >6 bands were considered to belong to different clones [14].

Definitions

A case of intestinal colonization was defined as a child or a mother with *E. cloacae* isolated from a rectal screening sample. No clinical data were collected to distinguish between infection and simple colonization. Thus, except for positive blood samples, a patient having one or more positive clinical samples for *E. cloacae* was considered as colonized/infected. A clone was defined as epidemic if it was found in more than four inpatients, micro-epidemic if in between two and four inpatients or sporadic (Sp) if in

only one child, whatever the nature of the sample (screening or diagnostic). MTCT of *E. cloacae* was confirmed if one of the strains from a child was identical to one from the mother. The assessment of impact of CT and MTCT on epidemiology of *E. cloacae* in neonatal units was performed on the cohort of children born in our hospital and transferred in these units during the year 2004.

Results

E. cloacae screening and clinical isolates

From December 2002 to December 2004, a total of 735 children were included in the study, and 166 (22.6%) of them had *E. cloacae* intestinal colonization. In 2004, 125 mothers were screened for *E. cloacae* intestinal colonization, and 16 (12.8%) were carriers. During the survey period, 29 (3.9%) patients gave clinical samples positive for *E. cloacae*, giving a total of 33 clinical isolates (Table 1).

Antibiotic susceptibility results

The results of the antibiograms of the *E. cloacae* clinical isolates are listed in Table 1. No isolate producing ESBL was detected during the 2-year survey. All isolates were susceptible to the other major anti-microbial classes, including aminoglycosides and fluoroquinolones (Fig. 1).

Genotyping results

PFGE analysis revealed 90 different pulsotypes in the 199 clinical and screening isolates from neonates: three epidemic clones (A, B and C found in 19, 33 and 7 patients, respectively), 21 micro-epidemic clones (D to X, for a total of 61 patients) and 66 unrelated strains classified as sporadic clones (Sp). The time distributions of the PFGE patterns (Figs. 2 and 3) evidenced clusters of colonization and infection. There was a succession of clonal outbreaks of colonization and infection involving, in particular, clone A from December 2002 to January 2003 and clone B from December 2002 to October 2003. There were three epidemic episodes involving patients with *E. cloacae*-positive clinical samples (Fig. 3): in December 2002 (eight patients, including six with clone A), in February 2003 (five patients, including two with clone B) and in May/June 2003 (four patients, including two with clone B). No new cases of *E. cloacae* intestinal colonization was detected in April 2003 (Fig. 1). This result was contemporary with the reduction/limitation of admissions implemented to manage outbreak. The epidemic clones decreased progressively as a proportion of all clones isolated (Fig. 1), in favor of micro-epidemic and sporadic clones (post-outbreak period).

PFGE analysis of screening isolates from five randomly selected children gave the following results: firstly, in a screening sample positive for *E. cloacae*, there was a single clone (the five colonies having indistinguishable PFGE patterns) and secondly, isolates from successive screening samples (once a week) from a single neonate showed different PFGE patterns for two of the five infants (at least one differing from the others).

Genotyping of screening isolates from mothers revealed a great diversity of clones (more than 80% being unrelated strains).

Mother-to-child transmission of *E. cloacae*

Mother-to-child transmission of *E. cloacae* was studied for 125 mother/child pairs (corresponding to a total of 147 children; Fig. 3). Of the 16 *E. cloacae*-positive mothers, only 5 had 1 or more children who were *E. cloacae* carriers. Of these five possible cases of MTCT, only two were confirmed by PFGE analysis. Thus, 2 of the 16 *E. cloacae*-positive mothers (12.5%) transmitted this microorganism to their children (three newborns, including one pair of twins). Moreover, 27 *E. cloacae*-positive children were born to negative mothers. Thus, MTCT of *E. cloacae* was directly responsible for 8.8% (3 of the 34 *E. cloacae*-positive children) of intestinal colonization of the neonates with this bacterial species. There was no infection associated with these strains (H and I) during the study period. In contrast, both clones were responsible for cross-colonization (micro-epidemic clones H and I, found in three and two neonates, respectively). These clones had never been encountered before.

Discussion

This surveillance program (screening and genotyping) in our neonatal department improves our knowledge about the dynamics of the spread of *E. cloacae* in neonates. Indeed, surveillance during the outbreak period and the non-outbreak period confirms the role of children as a major reservoir of this bacterial species [15–17]. This reservoir can be fed by different sources. We found that MTCT (vertical transmission) constitutes one of these sources, even if it is a minor contributor: however, it is not clear when contamination occurs, whether it is during delivery or subsequently, and if the mode of delivery affects the risk of MTCT. Women with high-risk pregnancies often receive antibiotic treatment (for example, for urinary tract infection or preterm premature rupture of membranes), with subsequent modification of the *Enterobacteriaceae* population residing in the intestinal tract and various mucous membranes. Contamination during delivery is entirely plausible,

Table 1 Characteristics of clinical *Enterobacter cloacae* isolates from the neonatal department

	Patient		<i>E. cloacae</i> clinical isolates			Antibiotic resistance pattern [‡]	PFGE pattern [#]
	No.	Unit	Date of isolation	Source	Rectal carriage*		
Outbreak phase	1	PU	12/03/02	Blood	ND	WT	A
	2	PU	12/04/02	Urine	ND	WT	A
	3	PICU	12/04/02	Catheter	ND	WT	Sp
	4	PU	12/04/02	Blood	Negative	WT	A
	5	PU	12/06/02	Blood	Positive (s)	WT	A
	6	PU	12/10/02	Urine	Positive (s)	WT	A
	7	PU	12/20/02	Eye	Negative	WT	A
	8	PU	12/21/02	Throat swab	ND	WT	Sp
	9	PICU	01/20/03	Urine	Positive (s)	HLBL	Sp
	10	PU	01/22/03	Urine	Positive	WT	ND
	11	PU	02/11/03	Blood	Positive (d)	WT	Sp
	12	PU	02/17/03	Urine	Positive (s)	WT	Sp
	13	PICU	02/22/03	Tracheal aspirate	Positive (s)	WT	B
		PICU	02/22/03	Blood	Positive (s)	WT	B
	14	PU	02/26/03	Urine	Positive (s)	WT	B
	15	PU	02/26/03	Blood	Positive (s)	WT	E
	16	PICU	03/13/03	Gastric fluid	Negative	WT	ND
	17	PU	05/21/03	Eye	Positive (s)	WT	B
	18	PU	06/11/03	Blood	Negative	WT	ND
		PICU	06/11/03	CSF	Negative	WT	ND
	19	PICU	06/14/03	Blood	Negative	WT	ND
	20	PU	06/25/03	Peritoneal exudate	Positive (s)	WT	B
	21	PICU	11/08/03	Wound	Positive (d)	HLBL	Sp
	PICU	11/27/03	Urine	Positive (d)	HLBL	C	
22	PICU	12/18/03	Blood	Negative	WT	Sp	
23	PU	12/27/03	Wound	Positive (s)	WT	R	
Non-outbreak phase	24	PU	03/02/04	Urine	Positive (s)	WT	Sp
	25	PU	04/26/04	Eye	Positive	WT	ND
	26	PICU	07/20/04	Blood	Positive (s)	HLBL	Sp
		PICU	07/23/04	Wound	Positive (s)	HLBL	Sp
	27	PICU	10/14/04	Eye	Positive (d)	WT	N
	28	PICU	11/30/04	Wound	Positive (s)	WT	U
29	PICU	12/02/04	Tracheal aspirate	Positive (s)	HLBL	Sp	

*Results of rectal screening: screening isolate and clinical isolate belonging to the same clone (s) or to different clones (d)

[‡]Antibiotic resistance patterns: wild type (WT: resistant to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and cefalothin), high-level β -lactamase producers (HLBL: wild-type antibiotic resistance pattern + resistant or intermediate to ceftazidime and/or cefotaxime and without extended-spectrum β -lactamase production)

[#]PFGE patterns: epidemic clones (A, B and C), micro-epidemic clones (E, N, R, U) and sporadic clones (Sp)

CSF: cerebrospinal fluid; PFGE: pulsed-field gel electrophoresis; ND: not determined; PU: premature unit; PICU: pediatric intensive care unit

Fig. 1 Time distribution of PFGE patterns of *Enterobacter cloacae* screening isolates (new cases of intestinal colonization) in neonatal units

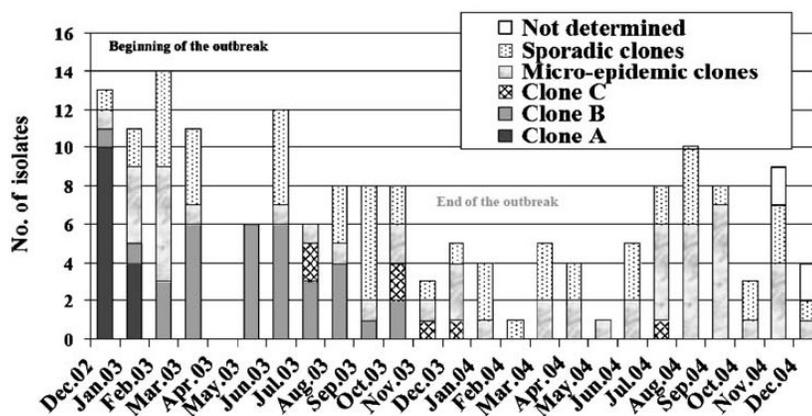
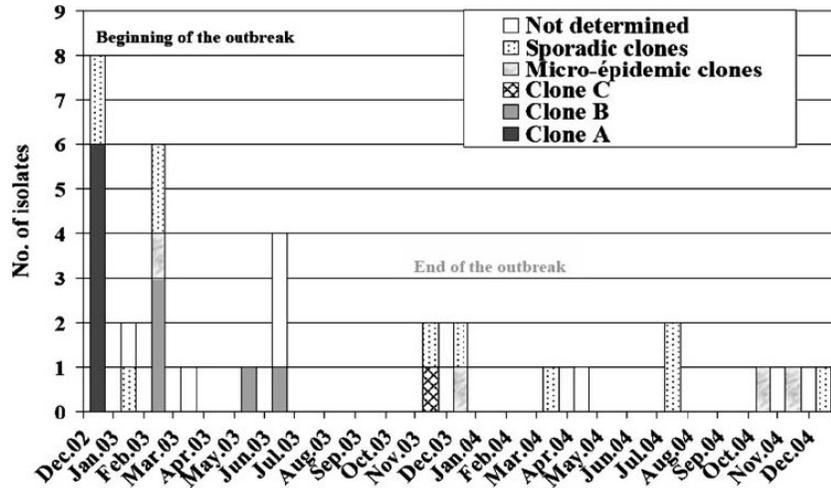


Fig. 2 Time distribution of PFGE patterns of *Enterobacter cloacae* clinical isolates (new cases) in the neonatal units

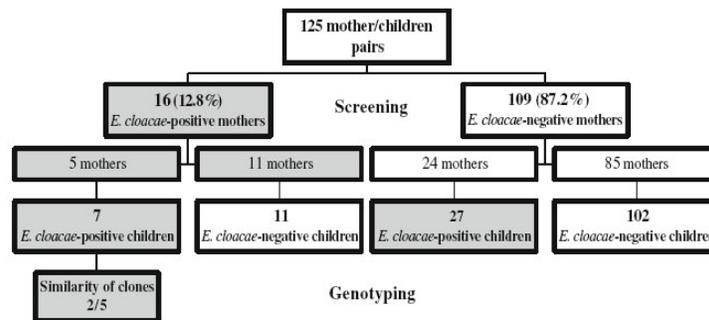


but further investigations are needed to elucidate if the mode of delivery (vaginal delivery or caesarean-section delivery) modifies the risk of MTCT.

The changes in the profiles of epidemic clones (A and B) from December 2002 to their disappearance in October 2003, following reinforcement of hygiene measures and implementation of a strict cohorting, suggests that patient-to-patient transmission (horizontal transmission) was the major route of contamination. CT via healthcare workers' hands and/or medical equipment has been demonstrated in several reports [7, 18] and was the most likely mechanism to explain emergence of *E. cloacae* in our hospital, even if healthcare workers' hands were not sampled for culture. Indeed, even during the non-outbreak period, cases of cross-colonization were detected involving micro-epidemic clones (Fig. 1). These cases of CT reflect a lack of compliance with infection control measures by medical and nursing staff. The central concept in preventing CT is good compliance with hand hygiene procedures by healthcare workers after handling each patient. This was illustrated by the striking improvement of the epidemiological situation in our neonatal department in terms of

colonization and infection with *E. cloacae* (notably cases of CT). Among the 147 neonates from 125 mother/child pairs investigated, 34 (23.1%) carried *E. cloacae* in the intestinal tract. The possible sources of this carriage are MTCT, CT (epidemic and micro-epidemic clones, by excluding index cases that are linked to clones which were initially sporadic) and other sources (OS) unidentified in this study (sporadic clones). These sporadic clones are from MTCT or OS. The sources of intestinal colonization of the neonates were MTCT (8.8%), CT (41.2%) and OS (50%). CT constitutes the most likely common exogenous source. The origin of sporadic clones remains unknown. However, environmental sources and the feeding regimen (breast-fed infants *versus* formula-fed infants) may contribute. Several reports [19–20] showed differences in development of intestinal flora between breast-fed infants (bifidobacteria, lactobacilli and streptococci) and formula-fed infants (*Bacteroides*, bifidobacteria, staphylococci, enterobacteria and clostridia). In addition, these studies suggest that breastfeeding from the first day of life reduces colonization with *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Citrobacter* species [20–21].

Fig. 3 Mother-to-child transmission of *Enterobacter cloacae* intestinal colonization detected by PFGE analysis



In a previous study [11], we showed that the emergence and spread of *E. cloacae* in PU was not significantly related to antibiotic use policy, especially that for third generation cephalosporins. Moreover, most of the clinical isolates were susceptible to these antibiotics. Therefore, this is primarily a hygiene issue.

Molecular epidemiological tools, especially PFGE analysis, are useful for investigating the spread of *E. cloacae* both during an outbreak and at other times. To our knowledge, this is the first study that investigates the dynamics of the spread of *E. cloacae* in neonatal units, including mothers, and involving genotyping so many clinical and screening isolates (almost 200), over so long a period (2 years), including both outbreak and non-outbreak periods. Thus, our study provides a detailed epidemiological picture of the spread of this bacterial species in neonates.

Genotyping of all screening isolates from individual infants demonstrated that clones sometimes varied from one week to the next. This suggests that typing the first isolate only leads to underestimation of cross-colonization. The lack of clinical data (antibiotic treatment, feeding, etc.) in our study was the main limitation to developing a better understanding of the dynamics of acquisition of this microorganism in newborns and to investigating other exogenous sources.

References

- Gaston MA (1988) *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. *J Hosp Infect* 11:197–208
- Sanders Jr WE, Sanders CC (1997) *Enterobacter spp.*: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 10:220–241
- Bingen E, Denamur E, Lambert-Zechovsky N, Brahimi N, El lakany M, Elion J (1992) Rapid genotyping shows the absence of cross-contamination in *Enterobacter cloacae* nosocomial infection. *J Hosp Infect* 21:95–101
- Lambert-Zechovsky N, Bingen E, Denamur E et al (1992) Molecular analysis provides evidence for the endogenous origin of bacteremia and meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an infant. *Clin Infect Dis* 15:30–32
- Wang CC, Chu ML, Ho LJ, Hwang RC (1991) Analysis of plasmid pattern in pediatric intensive care unit outbreaks of nosocomial infection due to *Enterobacter cloacae*. *J Hosp Infect* 19:33–40
- Tresoldi AT, Padoveze MC, Trabasso P et al (2000) *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. *Am J Infect Control* 28:258–261
- Harbarth S, Sudre P, Dharan S et al (1999) Outbreak of *Enterobacter cloacae* related to understaffing, overcrowding, and poor hygiene practices. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20:598–603
- Van den Berg RWA, Claahsen HL, Niessen M, Muytjens HL, Liem K, Voss A (1999) *Enterobacter cloacae* in the NICU related to disinfected thermometers. *J Hosp Infect* 45:29–34
- Fernandez-Baca V, Ballesteros F, Hervas JA et al (2001) Molecular epidemiological typing of *Enterobacter cloacae* isolates from a neonatal intensive care unit: 3-year prospective study. *J Hosp Infect* 49:173–182
- Falkiner FR (1992) *Enterobacter* in hospital. *J Hosp Infect* 20:137–140
- Talon D, Menget A, Thouverez M et al (2004) Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Hosp Infect* 57:119–125
- Members of SFM Antibiogram Committee (2003) Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Report 2003. *Int J Antimicrob Agents* 21:364–391
- Bertrand X, Hocquet D, Boisson K, Siebor C, Plésiat P, Talon D (2003) Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int J Antimicrob Agents* 22:128–133
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–2239
- Goldmann DA, Leclair J, Maccone A (1978) Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment. *J Pediatr* 93:288–293
- Almuneef MA, Baltimore RS, Farrel PA, Reagan-Ciricione P, Dembry LM (2001) Molecular typing demonstrating transmission of gram-negative rods in a neonatal intensive care unit in the absence of a recognized epidemic. *Clin Infect Dis* 32:220–227
- Toltzis P, Dul MJ, Hohen C et al (2001) Molecular epidemiology of antibiotic-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit during a non-outbreak period. *Pediatrics* 108:1143–1148
- Verweij PE, Van Belkum A, Melchers WJ, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF (1995) Interrepeat fingerprinting of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacter cloacae* isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16:25–29
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC et al (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30:61–67
- Adlerberth I, Carlsson B, de Man P et al (1991) Intestinal colonization with *Enterobacteriaceae* in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr Scand* 80:602–610
- Wold AE, Adlerberth I (2000) Breast feeding and the intestinal microflora of the infant-implications for protection against infectious diseases. *Adv Exp Med Biol* 478:77–93
- White RD, Townsend TR, Stephens MA, Moxon ER (1981) Are surveillance of resistance enteric bacilli and antimicrobial usage among neonates in a newborn intensive care unit useful. *Pediatrics* 68:1–4

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en œuvre un certain nombre d'outils nous permettant d'explorer différentes dimensions de l'épidémiologie des BMR à l'échelle d'un hôpital universitaire régional ou de l'inter-région Est. En effet, nous avons montré que le profil de résistance aux antibiotiques constitue un outil utile et pertinent pour la détection de souches de SARM productrices de toxines PVL ou TSST-1. De plus, des approches écologiques temporelles nous ont permis de démontrer l'efficacité de mesures d'hygiène (précautions complémentaires, utilisation de produits hydro-alcooliques...) dans le contrôle de la diffusion de *A. baumannii* et de SARM au sein du CHU de Besançon. Une approche multiniveau nous a permis d'apporter un éclairage nouveau sur la part relative des caractéristiques individuelles des patients, identifiée comme prépondérante par rapport au contexte (écologie) dans l'hétérogénéité de la prévalence des infections à *P. aeruginosa* au sein des hôpitaux de l'Est de la France. En outre, l'épidémiologie moléculaire de *P. aeruginosa* multi-résistant au CHU de Besançon révélait que les souches multi-résistantes de cette bactérie semblent émerger parmi des souches moins résistantes qui elles sont endémiques et diffusent largement par transmission croisée. Par ailleurs, la même approche montrait que l'émergence de *E. coli* producteur de BLSE au niveau de l'inter-région Est impliquait un clone majeur, le clone intercontinental O25 : H4-ST131 qui représentait environ 30% des souches de cette BMR, appartenait au groupe phylogénétique B2 et présentait une BLSE de type CTX-M-15 principalement.

L'environnement représente la troisième dimension de la triade épidémiologique : individu, temps et espace. En fonction de l'échelle d'observation, il peut être défini à différents niveaux et caractérisé par des facteurs spécifiques. Dans le domaine médical, la dimension écologique a été longtemps négligée en faveur d'approches centrées sur l'individu. Au cours, de cette dernière décennie, le développement de l'approche multiniveau a permis d'intégrer cette dimension dans plusieurs études. Cependant, ces travaux utilisaient souvent des données collectées pour des études classiques de niveau individuel. De ce fait, à la fois la structure des données ainsi que la qualité des informations de niveau groupe étaient limitées. Une seconde limite tient aux indicateurs disponibles (variables écologiques) qui pour certains restent à définir et à valider. Toutefois, les études multiniveaux permettent de dépasser les limites de l'approche écologique classique (biais écologique) et de compléter l'approche individuelle en investiguant de façon simultanée et appropriée l'effet de

facteurs définis à plusieurs niveaux sur un paramètre de santé. Elles rendent possibles l'estimation d'effets écologiques après ajustement sur des variables de niveau individuel. Dans le domaine de l'émergence et de la diffusion des BMR, le rôle de l'écologie est indéniable. L'utilisation de ce type d'approche devrait être fortement encouragée ; les études épidémiologiques sur cette problématique, notamment les études multicentriques devraient intégrer dès leur conception cet aspect multidimensionnel des facteurs modifiant l'émergence et la diffusion des BMR.

Finalement, l'étude de ces phénomènes émergents au sein des BMR montre que le contrôle de la multi-résistance bactérienne représente un défi d'aujourd'hui et de demain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] FLEMING A. Penicillin - Nobel Lecture. 1945 [Consulté le 20/01/2010]. Disponible sur: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf
- [2] VANDENESCH F, NAIMI T, ENRIGHT MC, LINA G, NIMMO GR, HEFFERNAN H, LIASSINE N, BES M, GREENLAND T, REVERDY ME, ETIENNE J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9, p. 978-984.
- [3] NAIMI TS, LEDELL KH, COMO-SABETTI K, BORCHARDT SM, BOXRUD DJ, ETIENNE J, JOHNSON SK, VANDENESCH F, FRIDKIN S, O'BOYLE C, DANILA RN, LYNFIELD R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Jama*, 2003, 290, p. 2976-2984.
- [4] NICOLAS-CHANOINE MH, BLANCO J, LEFLON-GUIBOUT V, DEMARTY R, ALONSO MP, CANICA MM, PARK YJ, LAVIGNE JP, PITOUT J, JOHNSON JR. Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61, p. 273-281.
- [5] PEIRANO G, PITOUT JD. Molecular epidemiology of Escherichia coli producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 35, p. 316-321.
- [6] PITOUT JD, LAUPLAND KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8, p. 159-166.
- [7] CDC. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin--United States, 1989-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1993, 42, p. 597-599.
- [8] WERNER G, COQUE TM, HAMMERUM AM, HOPE R, HRYNIEWICZ W, JOHNSON A, KLARE I, KRISTINSSON KG, LECLERCQ R, LESTER CH, LILLIE M, NOVAIS C, OLSSON-LILJEQUIST B, PEIXE LV, SADOWY E, SIMONSEN GS, TOP J, VUOPIO-VARKILA J, WILLEMS RJ, WITTE W, WOODFORD N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill* 2008 13(47) [Consulté le 20 décembre 2009]. Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19046>
- [9] LUCET JC, ANDREMONT A, COIGNARD B. Les entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG) : situation épidémiologique, mesures de contrôle actuelles et enjeux à venir. *BEH* 2008 41-42 / 4 novembre [Consulté le 2 février 2010]. Disponible sur: http://www.invs.sante.fr/beh/2008/41_42/beh_41_42_2008.pdf
- [10] SIEVERT DM, RUDRIK JT, PATEL JB, MCDONALD LC, WILKINS MJ, HAGEMAN JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis*, 2008, 46, p. 668-674.

- [11] VALENCIA R, ARROYO LA, CONDE M, ALDANA JM, TORRES MJ, FERNANDEZ-CUENCA F, GARNACHO-MONTERO J, CISNEROS JM, ORTIZ C, PACHON J, AZNAR J. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2009, 30, p. 257-263.
- [12] SOULI M, GALANI I, GIAMARELLOU H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008 13 (47) [Consulté le 20 décembre 2009]. Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19045>
- [13] FALAGAS ME, BLIZIOTIS IA. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 29, p. 630-636.
- [14] LIVERMORE DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64 Suppl 1, p. i29-36.
- [15] BOUCHER HW, TALBOT GH, BRADLEY JS, EDWARDS JE, GILBERT D, RICE LB, SCHELD M, SPELLBERG B, BARTLETT J. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2009, 48, p. 1-12.
- [16] RÉSEAU D'ALERTE D'INVESTIGATION ET DE SURVEILLANCE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES (RAISIN). Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France – Réseau BMR-Raisin – Résultats 2007. 2009 [Consulté le 02/02/2010]. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/raisin/>
- [17] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World - Fourth Global Report. 2008 [Consulté le 20/12/2009]. Disponible sur: http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.394_eng.pdf
- [18] FALAGAS ME, KOLETISI PK, BLIZIOTIS IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 2006, 55, p. 1619-1629.
- [19] FALAGAS ME, KARAGEORGOPOULOS DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis*, 2008, 46, p. 1121-1122; author reply 1122.
- [20] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Emerging diseases. 2009 [Consulté le 20/12/2009]. Disponible sur: http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/

- [21] LOWY FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998, 339, p. 520-532.
- [22] JEVONS MP, COE AW, PARKER MT. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet*, 1963, 1, p. 904-907.
- [23] WU S, PISCITELLI C, DE LENCASTRE H, TOMASZ A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist*, 1996, 2, p. 435-441.
- [24] COUTO I, DE LENCASTRE H, SEVERINA E, KLOOS W, WEBSTER JA, HUBNER RJ, SANCHES IS, TOMASZ A. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist*, 1996, 2, p. 377-391.
- [25] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2002, 51, p. 565-567.
- [26] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--New York, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2004, 53, p. 322-323.
- [27] ALBERTINI MT, BENOIT C, BERARDI L, BERROUANE Y, BOISIVON A, CAHEN P, CATTOEN C, COSTA Y, DARCHIS P, DELIERE E, DEMONTROND D, EB F, GOLLIOT F, GRISE G, HAREL A, KOECK JL, LEPENNEC MP, MALBRUNOT C, MARCOLLIN M, MAUGAT S, NOUVELLON M, PANGON B, RICOUART S, ROUSSEL-DELVALLEZ M, VACHEE A, CARBONNE A, MARTY L, JARLIER V. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. *J Hosp Infect*, 2002, 52, p. 107-113.
- [28] DIEKEMA DJ, PFALLER MA, SCHMITZ FJ, SMAYEVSKY J, BELL J, JONES RN, BEACH M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, 2001, 32 Suppl 2, p. S114-132.
- [29] WITTE W, KRESKEN M, BRAULKE C, CUNY C. Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. *Clin Microbiol Infect*, 1997, 3, p. 414-422.
- [30] AIRES DE SOUSA M, DE LENCASTRE H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 40, p. 101-111.

- [31] AYLIFFE GA. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 1997, 24 Suppl 1, p. S74-79.
- [32] BOYCE JM, POTTER-BYNOE G, CHENEVERT C, KING T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997, 18, p. 622-627.
- [33] DELEO FR, CHAMBERS HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*, 2009, 119, p. 2464-2474.
- [34] EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS). EARSS Annual Report. 2008 Consulté le 10/01/2010]. Disponible sur: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf
- [35] GRUNDMANN H, AANENSEN DM, VAN DEN WIJNGAARD CC, SPRATT BG, HARMSSEN D, FRIEDRICH AW. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med*, 2010, 7, p. e1000215.
- [36] UDO EE, PEARMAN JW, GRUBB WB. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J Hosp Infect*, 1993, 25, p. 97-108.
- [37] WEBER JT. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, 2005, 41 Suppl 4, p. S269-272.
- [38] ZETOLA N, FRANCIS JS, NUERMBERGER EL, BISHAI WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5, p. 275-286.
- [39] BABA T, TAKEUCHI F, KURODA M, YUZAWA H, AOKI K, OGUCHI A, NAGAI Y, IWAMA N, ASANO K, NAIMI T, KURODA H, CUI L, YAMAMOTO K, HIRAMATSU K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002, 359, p. 1819-1827.
- [40] DIEP BA, CARLETON HA, CHANG RF, SENSABAUGH GF, PERDREAU-REMYINGTON F. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 2006, 193, p. 1495-1503.
- [41] DIEP BA, PERDREAU-REMYINGTON F, SENSABAUGH GF. Clonal characterization of *Staphylococcus aureus* by multilocus restriction fragment typing, a rapid screening approach for molecular epidemiology. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, p. 4559-4564.

- [42] ROBINSON DA, KEARNS AM, HOLMES A, MORRISON D, GRUNDMANN H, EDWARDS G, O'BRIEN FG, TENOVER FC, MCDUGAL LK, MONK AB, ENRIGHT MC. Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone. *Lancet*, 2005, 365, p. 1256-1258.
- [43] DIEP BA, OTTO M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol*, 2008, 16, p. 361-369.
- [44] DURAND G, BES M, MEUGNIER H, ENRIGHT MC, FOREY F, LIASSINE N, WENGER A, KIKUCHI K, LINA G, VANDENESCH F, ETIENNE J. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. *J Clin Microbiol*, 2006, 44, p. 847-853.
- [45] VAN DER MEE-MARQUET N, LINA G, QUENTIN R, YAOUANG-LAPALLE H, FIEVRE C, TAKAHASHI N, ETIENNE J. Staphylococcal exanthematous disease in a newborn due to a virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain containing the TSST-1 gene in Europe: an alert for neonatologists. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, p. 4883-4884.
- [46] CHINI V, PETINAKI E, MEUGNIER H, FOKA A, BES M, ETIENNE J, DIMITRACOPOULOS G, SPILIOPOULOU I. Emergence of a new clone carrying Panton-Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome mec type V among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Greece. *Scand J Infect Dis*, 2008, 40, p. 368-372.
- [47] DAVID MD, KEARNS AM, GOSSAIN S, GANNER M, HOLMES A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect*, 2006, 64, p. 244-250.
- [48] OTTER JA, FRENCH GL. The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000-2006. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14, p. 670-676.
- [49] LARSEN AR, STEGGER M, BOCHER S, SORUM M, MONNET DL, SKOV RL. Emergence and characterization of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Denmark, 1999 to 2006. *J Clin Microbiol*, 2009, 47, p. 73-78.
- [50] SKOV RL, JENSEN KS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. *J Hosp Infect*, 2009, 73, p. 364-370.
- [51] POPOVICH KJ, WEINSTEIN RA, HOTA B. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? *Clin Infect Dis*, 2008, 46, p. 787-794.

- [52] COQUE TM, BAQUERO F, CANTON R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 2008 [Consulté le 20/01/2010]. Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>
- [53] COQUE TM, NOVAIS A, CARATTOLI A, POIREL L, PITOUT J, PEIXE L, BAQUERO F, CANTON R, NORDMANN P. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14, p. 195-200.
- [54] SUZUKI S, SHIBATA N, YAMANE K, WACHINO J, ITO K, ARAKAWA Y. Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63, p. 72-79.
- [55] CANTON R, NOVAIS A, VALVERDE A, MACHADO E, PEIXE L, BAQUERO F, COQUE TM. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 Suppl 1, p. 144-153.
- [56] MENDONCA N, LEITAO J, MANAGEIRO V, FERREIRA E, CANICA M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, p. 1946-1955.
- [57] RODRIGUEZ-BANO J, NAVARRO MD, ROMERO L, MUNIAIN MA, PEREA EJ, PEREZ-CANO R, HERNANDEZ JR, PASCUAL A. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis*, 2006, 42, p. 37-45.
- [58] CARRER A, LASSEL L, FORTINEAU N, MANSOURI M, ANGUEL N, RICHARD C, NORDMANN P. Outbreak of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in the Intensive Care Unit of a French Hospital. *Microb Drug Resist*, 2009, 15, p. 47-54.
- [59] DAMJANOVA I, TOTH A, PASZTI J, HAJBEL-VEKONY G, JAKAB M, BERTA J, MILCH H, FUZI M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62, p. 978-985.
- [60] LYTSY B, SANDEGREN L, TANO E, TORELL E, ANDERSSON DI, MELHUS A. The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *Apmis*, 2008, 116, p. 302-308.

- [61] GALAS M, DECOUSSER JW, BRETON N, GODARD T, ALLOUGH PY, PINA P. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52, p. 786-789.
- [62] BRASME L, NORDMANN P, FIDEL F, LARTIGUE MF, BAJOLET O, POIREL L, FORTE D, VERNET-GARNIER V, MADOUX J, REVEIL JC, ALBA-SAUVIAT C, BAUDINAT I, BINEAU P, BOUQUIGNY-SAISON C, ELOY C, LAFAURIE C, SIMEON D, VERQUIN JP, NOEL F, STRADY C, DE CHAMPS C. Incidence of class A extended-spectrum beta-lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60, p. 956-964.
- [63] RODRIGUEZ-BANO J, NAVARRO MD, ROMERO L, MARTINEZ-MARTINEZ L, MUNIAIN MA, PEREA EJ, PEREZ-CANO R, PASCUAL A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, p. 1089-1094.
- [64] VALVERDE A, GRILL F, COQUE TM, PINTADO V, BAQUERO F, CANTON R, COBO J. High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, p. 2796-2799.
- [65] BRIGANTE G, LUZZARO F, PERILLI M, LOMBARDI G, COLI A, ROSSOLINI GM, AMICOSANTE G, TONIOLO A. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents*, 2005, 25, p. 157-162.
- [66] WOODFORD N, KAUFMANN ME, KARISIK E, HARTLEY JW. Molecular epidemiology of multiresistant *Escherichia coli* isolates from community-onset urinary tract infections in Cornwall, England. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59, p. 106-109.
- [67] PITOUT JD, HOSSAIN A, HANSON ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, p. 5715-5721.
- [68] ARPIN C, COULANGE L, DUBOIS V, ANDRE C, FISCHER I, FOURMAUX S, GROBOST F, JULLIN J, DUTILH B, COUTURE JF, NOURY P, LAGRANGE I, DUCASTAING A, DOERMANN HP, QUENTIN C. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, p. 3440-3444.
- [69] ARPIN C, DUBOIS V, MAUGEIN J, JULLIN J, DUTILH B, BROCHET JP, LARRIBET G, FISCHER I, QUENTIN C. Clinical and molecular analysis of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing enterobacteria in the community setting. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, p. 5048-5054.

- [70] GOLDSTEIN FW. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. Multicentre Study Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19, p. 112-117.
- [71] OTEO J, NAVARRO C, CERCENADO E, DELGADO-IRIBARREN A, WILHELMI I, ORDEN B, GARCIA C, MIGUELANEZ S, PEREZ-VAZQUEZ M, GARCIA-COBOS S, ARACIL B, BAUTISTA V, CAMPOS J. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol*, 2006, 44, p. 2359-2366.
- [72] PITOUT JD, NORDMANN P, LAUPLAND KB, POIREL L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 56, p. 52-59.
- [73] BERTRAND X, HOCQUET D, BOISSON K, SIEBOR E, PLESIAT P, TALON D. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 22, p. 128-133.
- [74] CLERMONT O, LAVOLLAY M, VIMONT S, DESCHAMPS C, FORESTIER C, BRANGER C, DENAMUR E, ARLET G. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61, p. 1024-1028.
- [75] LAU SH, KAUFMANN ME, LIVERMORE DM, WOODFORD N, WILLSHAW GA, CHEASTY T, STAMPER K, REDDY S, CHEESBROUGH J, BOLTON FJ, FOX AJ, UPTON M. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 62, p. 1241-1244.
- [76] BOYD DA, TYLER S, CHRISTIANSON S, MCGEER A, MULLER MP, WILLEY BM, BRYCE E, GARDAM M, NORDMANN P, MULVEY MR. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, p. 3758-3764.
- [77] NOVAIS A, CANTON R, MOREIRA R, PEIXE L, BAQUERO F, COQUE TM. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, p. 796-799.
- [78] POIREL L, LARTIGUE MF, DECOUSSER JW, NORDMANN P. ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, p. 447-450.

- [79] GIAMARELLOU H, ANTONIADOU A, KANELLAKOPOULOU K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 32, p. 106-119.
- [80] GOOTZ TD, MARRA A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008, 6, p. 309-325.
- [81] PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21, p. 538-582.
- [82] FOURNIER PE, RICHET H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*, 2006, 42, p. 692-699.
- [83] JOLY-GUILLOU ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11, p. 868-873.
- [84] WENDT C, DIETZE B, DIETZ E, RUDEN H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol*, 1997, 35, p. 1394-1397.
- [85] VILA J, MARTI S, SANCHEZ-CESPEDES J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59, p. 1210-1215.
- [86] POIREL L, NORDMANN P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12, p. 826-836.
- [87] MAGNET S, COURVALIN P, LAMBERT T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45, p. 3375-3380.
- [88] CORVEC S, CAROFF N, ESPAZE E, GIRAUDEAU C, DRUGEON H, REYNAUD A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52, p. 629-635.
- [89] ENDIMIANI A, LUZZARO F, MIGLIAVACCA R, MANTENGOLI E, HUJER AM, HUJER KM, PAGANI L, BONOMO RA, ROSSOLINI GM, TONIOLO A. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, p. 2211-2214.
- [90] NAAS T, NAMDARI F, REGLIER-POUPET H, POYART C, NORDMANN P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60, p. 1174-1176.

- [91] NAGANO N, NAGANO Y, CORDEVANT C, SHIBATA N, ARAKAWA Y. Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, p. 3978-3984.
- [92] VAHABOGLU H, OZTURK R, AYGUN G, COSKUNKAN F, YAMAN A, KAYGUSUZ A, LEBLEBICIOGLU H, BALIK I, AYDIN K, OTKUN M. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41, p. 2265-2269.
- [93] CARBONNE A, NAAS T, BLANCKAERT K, COUZIGOU C, CATTOEN C, CHAGNON JL, NORDMANN P, ASTAGNEAU P. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J Hosp Infect*, 2005, 60, p. 14-18.
- [94] POIREL L, MENUTEAU O, AGOLI N, CATTOEN C, NORDMANN P. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, p. 3542-3547.
- [95] PEREZ F, HUJER AM, HUJER KM, DECKER BK, RATHER PN, BONOMO RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, p. 3471-3484.
- [96] VILA J, RUIZ J, GONI P, JIMENEZ DE ANTA T. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 39, p. 757-762.
- [97] VILA J, RUIZ J, GONI P, MARCOS A, JIMENEZ DE ANTA T. Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39, p. 1201-1203.
- [98] RUZIN A, KEENEY D, BRADFORD PA. AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 59, p. 1001-1004.
- [99] BIEDENBACH DJ, MOET GJ, JONES RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004, 50, p. 59-69.
- [100] MCDONALD LC, BANERJEE SN, JARVIS WR. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis*, 1999, 29, p. 1133-1137.

- [101] PERENCEVICH EN, MCGREGOR JC, SHARDELL M, FURUNO JP, HARRIS AD, MORRIS JG, JR., FISMAN DN, JOHNSON JA. Summer Peaks in the Incidences of Gram-Negative Bacterial Infection Among Hospitalized Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008, 29, p. 1124-1131.
- [102] PLAYFORD EG, CRAIG JC, IREDELL JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect*, 2007, 65, p. 204-211.
- [103] DAS I, LAMBERT P, HILL D, NOY M, BION J, ELLIOTT T. Carbapenem-resistant *Acinetobacter* and role of curtains in an outbreak in intensive care units. *J Hosp Infect*, 2002, 50, p. 110-114.
- [104] WILKS M, WILSON A, WARWICK S, PRICE E, KENNEDY D, ELY A, MILLAR MR. Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006, 27, p. 654-658.
- [105] MARCHAIM D, NAVON-VENEZIA S, LEAVITT A, CHMELNITSKY I, SCHWABER MJ, CARMELI Y. Molecular and epidemiologic study of polyclonal outbreaks of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an Israeli hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007, 28, p. 945-950.
- [106] OTEO J, GARCIA-ESTEBANEZ C, MIGUELANEZ S, CAMPOS J, MARTI S, VILA J, DOMINGUEZ MA, DOCOBO F, LARROSA N, PASCUAL A, PINTADO V, COLL P. Genotypic diversity of imipenem resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in Spain. *J Infect*, 2007, 55, p. 260-266.
- [107] COELHO JM, TURTON JF, KAUFMANN ME, GLOVER J, WOODFORD N, WARNER M, PALEPOU MF, PIKE R, PITT TL, PATEL BC, LIVERMORE DM. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. *J Clin Microbiol*, 2006, 44, p. 3623-3627.
- [108] TURTON JF, KAUFMANN ME, WARNER M, COELHO J, DIJKSHOORN L, VAN DER REIJDEN T, PITT TL. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. *J Hosp Infect*, 2004, 58, p. 170-179.
- [109] NAAS T, COIGNARD B, CARBONNE A, BLANCKAERT K, BAJOLET O, BERNET C, VERDEIL X, ASTAGNEAU P, DESENCLOS JC, NORDMANN P. VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*, France. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12, p. 1214-1222.
- [110] PELEG AY, BELL JM, HOFMEYR A, WIESE P. Inter-country transfer of Gram-negative organisms carrying the VIM-4 and OXA-58 carbapenem-hydrolysing enzymes. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 57, p. 794-795.

- [111] GIAMARELLOU H, KANELLAKOPOULOU K. Current therapies for *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Clin*, 2008, 24, p. 261-278, viii.
- [112] RÉSEAU D'ALERTE D'INVESTIGATION ET DE SURVEILLANCE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES (RAISIN). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, France, juin 2006. Saint-Maurice (France): Institut de veille sanitaire; 2009.
- [113] LIVERMORE DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, 2002, 34, p. 634-640.
- [114] STRATEVA T, YORDANOV D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*, 2009, 58, p. 1133-1148.
- [115] HENRICHFREISE B, WIEGAND I, PFISTER W, WIEDEMANN B. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51, p. 4062-4070.
- [116] OLIVER A, CANTON R, CAMPO P, BAQUERO F, BLAZQUEZ J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 2000, 288, p. 1251-1254.
- [117] VETTORETTI L, PLESIAT P, MULLER C, EL GARCH F, PHAN G, ATTREE I, DUCRUIX A, LLANES C. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53, p. 1987-1997.
- [118] BLANC DS, FRANCIOLI P, ZANETTI G. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units - A Review. *Open Microbiol J*, 2007, 1, p. 8-11.
- [119] BERGMANS DC, BONTEN MJ, VAN TIEL FH, GAILLARD CA, VAN DER GEEST S, WILTING RM, DE LEEUW PW, STOBBERINGH EE. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax*, 1998, 53, p. 1053-1058.
- [120] BERTHELOT P, GRATTARD F, MAHUL P, PAIN P, JOSPE R, VENET C, CARRICAJA A, AUBERT G, ROS A, DUMONT A, LUCHT F, ZENI F, AUBOYER C, BERTRAND JC, POZZETTO B. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*, 2001, 27, p. 503-512.
- [121] BERTRAND X, THOUVEREZ M, TALON D, BOILLOT A, CAPELLIER G, FLORIOT C, HELIAS JP. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med*, 2001, 27, p. 1263-1268.

- [122] BONTEN MJ, BERGMANS DC, SPEIJER H, STOBBERINGH EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160, p. 1212-1219.
- [123] THUONG M, ARVANITI K, RUIMY R, DE LA SALMONIERE P, SCANVIC-HAMEG A, LUCET JC, REGNIER B. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect*, 2003, 53, p. 274-282.
- [124] BONOMO RA, SZABO D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 2006, 43 Suppl 2, p. S49-56.
- [125] LISTER PD, WOLTER DJ, HANSON ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22, p. 582-610.
- [126] HIGGINS PG, FLUIT AC, MILATOVIC D, VERHOEF J, SCHMITZ FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*, 2003, 21, p. 409-413.
- [127] HOCQUET D, NORDMANN P, EL GARCH F, CABANNE L, PLESIAT P. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50, p. 1347-1351.
- [128] DENTON M, KERR K, MOONEY L, KEER V, RAJGOPAL A, BROWNLEE K, ARUNDEL P, CONWAY S. Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*, 2002, 34, p. 257-261.
- [129] FALAGAS ME, KOPTERIDES P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. *J Hosp Infect*, 2006, 64, p. 7-15.
- [130] CAO B, WANG H, SUN H, ZHU Y, CHEN M. Risk factors and clinical outcomes of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Hosp Infect*, 2004, 57, p. 112-118.
- [131] OHMAGARI N, HANNA H, GRAVISS L, HACKETT B, PEREGO C, GONZALEZ V, DVORAK T, HOGAN H, HACHEM R, ROLSTON K, RAAD I. Risk factors for infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cancer. *Cancer*, 2005, 104, p. 205-212.

- [132] ZAVASCKI AP, CRUZ RP, GOLDANI LZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. *J Hosp Infect*, 2005, 59, p. 96-101.
- [133] DEFEZ C, FABBRO-PERAY P, BOUZIGES N, GOUBY A, MAHAMAT A, DAURES JP, SOTTO A. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. *J Hosp Infect*, 2004, 57, p. 209-216.
- [134] HSU DI, OKAMOTO MP, MURTHY R, WONG-BERINGER A. Fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for acquisition and impact on outcomes. *J Antimicrob Chemother*, 2005, 55, p. 535-541.
- [135] PARAMYTHIOTOU E, LUCET JC, TIMSIT JF, VANJAK D, PAUGAM-BURTZ C, TROUILLET JL, BELLOC S, KASSIS N, KARABINIS A, ANDREMONT A. Acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients in intensive care units: role of antibiotics with antipseudomonal activity. *Clin Infect Dis*, 2004, 38, p. 670-677.
- [136] CRESPO MP, WOODFORD N, SINCLAIR A, KAUFMANN ME, TURTON J, GLOVER J, VELEZ JD, CASTANEDA CR, RECALDE M, LIVERMORE DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, p. 5094-5101.
- [137] VALLES J, MARISCAL D, CORTES P, COLL P, VILLAGRA A, DIAZ E, ARTIGAS A, RELLO J. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*, 2004, 30, p. 1768-1775.
- [138] HOTA S, HIRJI Z, STOCKTON K, LEMIEUX C, DEDIER H, WOLFAARDT G, GARDAM MA. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2009, 30, p. 25-33.
- [139] HEDRICK TL, SCHULMAN AS, MCELEARNEY ST, SMITH RL, SWENSON BR, EVANS HL, TRUWIT JD, SCHELD WM, SAWYER RG. Outbreak of resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections during a quarterly cycling antibiotic regimen. *Surg Infect (Larchmt)*, 2008, 9, p. 139-152.
- [140] PAGANI L, COLINON C, MIGLIAVACCA R, LABONIA M, DOCQUIER JD, NUCLEO E, SPALLA M, LI BERGOLI M, ROSSOLINI GM. Nosocomial outbreak caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-13 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, p. 3824-3828.
- [141] DOUGLAS MW, MULHOLLAND K, DENYER V, GOTTLIEB T. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burns unit--an infection control study. *Burns*, 2001, 27, p. 131-135.

- [142] CENTRE DE COORDINATION DE LA LUTTE CONTRE LES INFECTIONS NOSOCOMIALES DE L'EST (C-CLIN EST). Surveillance des bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques dans l'inter-région Est – Résultats 2009. 2010 [Consulté le 10/03/2010]. Disponible sur: <http://cclin-est.fr/UserFiles/File/Surveillance/BMR/RAPPORT%20BMR%202009.pdf>
- [143] CZERNICHOW P, CHAPERON J, LE COUTOUR X. *Epidémiologie*. Masson, Paris 2001.
- [144] FABRY J. Surveillance des infections nosocomiales. Maîtrise des infections nosocomiales de A à Z. 1ère ed. France: Health & Co 2004.
- [145] FRENCH GL, CHENG AF, WONG SL, DONNAN S. Repeated prevalence surveys for monitoring effectiveness of hospital infection control. *Lancet*, 1989, 2, p. 1021-1023.
- [146] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Anatomic Therapeutic Chemical (ATC) classification index with defined daily doses (DDDs). Oslo, Norway: WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology; 2001.
- [147] SCHWARTZ S, SUSSER E, SUSSER M. A future for epidemiology? *Annu Rev Public Health*, 1999, 20, p. 15-33.
- [148] SUSSER M, SUSSER E. Choosing a future for epidemiology: I. Eras and paradigms. *Am J Public Health*, 1996, 86, p. 668-673.
- [149] SUSSER M, SUSSER E. Choosing a future for epidemiology: II. From black box to Chinese boxes and eco-epidemiology. *Am J Public Health*, 1996, 86, p. 674-677.
- [150] AKHTAR S, MOATTER T. Multilevel modeling of intra-household spread of hepatitis C virus infection, Karachi, Pakistan. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76, p. 446-449.
- [151] DIEZ ROUX AV, AIELLO AE. Multilevel analysis of infectious diseases. *J Infect Dis*, 2005, 191 Suppl 1, p. S25-33.
- [152] MAUNY F, VIEL JF, HANDSCHUMACHER P, SELLIN B. Multilevel modelling and malaria: a new method for an old disease. *Int J Epidemiol*, 2004, 33, p. 1337-1344.
- [153] MULLER A, MAUNY F, TALON D, DONNAN PT, HARBARTH S, BERTRAND X. Effect of individual- and group-level antibiotic exposure on MRSA isolation: a multilevel analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58, p. 878-881.

- [154] BLAKELY TA, WOODWARD AJ. Ecological effects in multi-level studies. *J Epidemiol Community Health*, 2000, 54, p. 367-374.
- [155] GOLDSTEIN H. *Multilevel Statistical Models*. E Arnold London 2003.
- [156] CENTRE FOR MULTILEVEL MODELLING (CMM). Multilevel Models : Types of Model. 2010 [Consulté le 20/01/2010]. Disponible sur: <http://www.cmm.bristol.ac.uk/>
- [157] HOX JJ. *Applied multi-level analysis*. TT-Publikaties Amsterdam 1995.
- [158] PANKRATZ A. *Forecasting with Dynamic Regression Models*. Wiley-Interscience Publication, USA 1991.
- [159] VAN BELKUM A, TASSIOS PT, DIJKSHOORN L, HAEGGMAN S, COOKSON B, FRY NK, FUSSING V, GREEN J, FEIL E, GERNER-SMIDT P, BRISSE S, STRUELENS M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13 Suppl 3, p. 1-46.
- [160] MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 1992, 24, p. 17-27.
- [161] SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230, p. 1350-1354.
- [162] FRENEY J, RENAUD F, LECLERCQ R, RIEGEL P. *Précis de bactériologie clinique*. ESKA Paris 2007.
- [163] ESPY MJ, UHL JR, SLOAN LM, BUCKWALTER SP, JONES MF, VETTER EA, YAO JD, WENGENACK NL, ROSENBLATT JE, COCKERILL FR, 3RD, SMITH TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19, p. 165-256.
- [164] OLIVEIRA DC, DE LENCASTRE H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46, p. 2155-2161.

- [165] JARRAUD S, MOUGEL C, THIOULOUSE J, LINA G, MEUGNIER H, FOREY F, NESME X, ETIENNE J, VANDENESCH F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*, 2002, 70, p. 631-641.
- [166] JANSSEN P, COOPMAN R, HUYS G, SWINGS J, BLEEKER M, VOS P, ZABEAU M, KERSTERS K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 1996, 142 (Pt 7), p. 1881-1893.
- [167] POWER EG. RAPD typing in microbiology--a technical review. *J Hosp Infect*, 1996, 34, p. 247-265.
- [168] VAN BELKUM A, KLUYTMANS J, VAN LEEUWEN W, BAX R, QUINT W, PETERS E, FLUIT A, VANDENBROUCKE-GRAULS C, VAN DEN BRULE A, KOELEMAN H, ET AL. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, 1995, 33, p. 1537-1547.
- [169] TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, MICKELSEN PA, MURRAY BE, PERSING DH, SWAMINATHAN B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33, p. 2233-2239.
- [170] MAIDEN MC, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, ZHANG Q, ZHOU J, ZURTH K, CAUGANT DA, FEAVERS IM, ACHTMAN M, SPRATT BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, p. 3140-3145.
- [171] ENRIGHT MC, DAY NP, DAVIES CE, PEACOCK SJ, SPRATT BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 2000, 38, p. 1008-1015.
- [172] ENRIGHT MC, SPRATT BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 1999, 7, p. 482-487.
- [173] COOPER JE, FEIL EJ. Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol*, 2004, 12, p. 373-377.
- [174] DAUWALDER O, LINA G, DURAND G, BES M, MEUGNIER H, JARLIER V, COIGNARD B, VANDENESCH F, ETIENNE J, LAURENT F. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*, 2008, 46, p. 3454-3458.
- [175] ROBERT J, ETIENNE J, BERTRAND X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11, p. 585-587.

[176] WITTE W, STROMMINGER B, CUNY C, HEUCK D, NUEBEL U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60, p. 1258-1263.

[177] KUHN L, DAVIDSON LL, DURKIN MS. Use of Poisson regression and time series analysis for detecting changes over time in rates of child injury following a prevention program. *Am J Epidemiol*, 1994, 140, p. 943-955.

[178] SOCIÉTÉ FRANÇAISE D'HYGIÈNE HOSPITALIÈRE (SFHH). PRÉVENTION DE LA TRANSMISSION CROISÉE : PRÉCAUTIONS COMPLÉMENTAIRES CONTACT. 2009 [Consulté le 10/03/2010]. Disponible sur: http://www.sfhh.net/telechargement/recommandations_preventiontransmissioncroiseeSFHH.pdf

PERMIS D'IMPRIMER

THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° 25.10.08

Présentée par ~~Madame, Monsieur,~~ **Houssein GBAGUIDI-HAORE**

Né(e) le **6 juin 1976 à Libreville (Gabon)**

et ayant pour titre :

**"Surveillance inter-régionale
des bactéries multi-résistantes émergentes :
approches éco-épidémiologiques et moléculaires".**

Vu et permis d'imprimer,

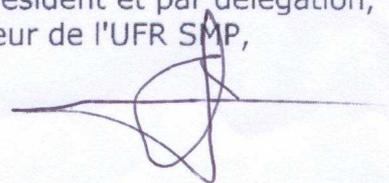
Besançon, le

1-7-2010

Le Directeur de Thèse,

*Professeur Xavier BERTRAND
Service d'Hygiène Hospitalière
et Infections Nosocomiales
CHU Jean Minjoz
25030 BESANCON Cedex*

Pour le Président et par délégation,
Le Directeur de l'UFR SMP,



E. SAMAIN

Professeur Emmanuel SAMAIN
Service d'Anesthésie
Réanimation Chirurgicale
CHU Jean Minjoz
25030 BESANCON Cedex ;

Surveillance inter-régionale des bactéries multi-résistantes émergentes : approches éco-épidémiologiques et moléculaires.

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, 18 juin 2010, Houssein GBAGUIDI-HAORE.

Résumé

Les années 2000 ont vu émerger des souches particulières de bactéries multi-résistantes (BMR) dans le cadre hospitalier, en France et dans le reste du monde. Ces BMR qui pour certaines sont en passe d'échapper à l'arsenal d'antibiotiques disponibles font craindre un retour à l'ère pré-antibiotique. L'objectif de cette thèse était de caractériser ces phénomènes émergents à l'échelle d'un hôpital universitaire régional ou de l'inter-région Est. Nous avons montré que le profil de résistance aux antibiotiques constitue un outil utile et pertinent pour la détection de souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) productrices de toxines PVL (leucocidine de Panton-Valentin) ou TSST-1 (toxine-1 du syndrome de choc toxique). De plus, des approches écologiques temporelles nous ont permis de démontrer l'efficacité de mesures d'hygiène (précautions complémentaires, utilisation de produits hydro-alcooliques...) dans le contrôle de la diffusion d'*Acinetobacter baumannii* et de SARM au sein du CHU de Besançon. Une approche multiniveau nous a permis d'apporter un éclairage nouveau sur la part relative des caractéristiques individuelles des patients, identifiée comme prépondérante par rapport au contexte (écologie) dans l'hétérogénéité de la prévalence des infections à *Pseudomonas aeruginosa* dans les hôpitaux de l'Est de la France. En outre, l'épidémiologie moléculaire de *P. aeruginosa* multi-résistant au CHU de Besançon révélait que les souches multi-résistantes de cette bactérie semblent émerger parmi des souches moins résistantes qui elles sont endémiques et diffusent largement par transmission croisée. Par ailleurs, la même approche montrait que l'émergence d'*Escherichia coli* producteur de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) au niveau de l'inter-région Est impliquait un clone majeur, le clone intercontinental O25 : H4-ST131 qui représentait environ 30% des souches de cette BMR, appartenait au groupe phylogénétique B2 et présentait une BLSE de type CTX-M-15 principalement. Finalement, l'étude de ces phénomènes émergents parmi les BMR montre que le contrôle de la multi-résistance bactérienne représente un défi d'aujourd'hui et de demain.

Mots-clés : bactéries multi-résistantes, éco-épidémiologie, modélisation multiniveau, séries temporelles, PCR, PFGE, MLST.

Surveillance of emerging multidrug-resistant bacteria: eco-epidemiological and molecular approaches.

Summary

During the 2000s, multidrug-resistant (MDR) strains of bacteria have emerged in the hospital setting worldwide. These MDR strains for which therapeutic options are extremely limited represent an increasing public health concern. The purpose of this thesis was to characterize these emerging phenomena in eastern hospitals of France. We showed that phenotypic rules based on antimicrobial resistance patterns are useful and pertinent for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harbouring Panton-Valentine leukocidin (PVL) or toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) genes. Temporal ecological studies demonstrated the effectiveness of infection control measures (barrier precautions, use of alcohol-based hand rub...) to prevent spread of *Acinetobacter baumannii* and MRSA in University Hospital of Besançon. Using a multilevel approach, we shed new light on relative share of individual factors (patient), identified as predominant compared with ecological factors (hospital) in the heterogeneity of the prevalence of patients infected with *Pseudomonas aeruginosa* in eastern hospitals of France. In addition, molecular epidemiology of MDR *P. aeruginosa* in University Hospital of Besançon revealed that these MDR strains seem to emerge under antibiotic selective pressure among less resistant strains, which spread widely by cross-transmission. Moreover, a similar approach showed that emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in eastern of France involved the intercontinental clone O25:H4-ST131. This major clone represented about 30% of strains, belonged to phylogenetic group B2 and produced an ESBL of CTX-M-15 type, mainly. Finally, study of these emerging phenomena highlighted the fact that control of MDR bacteria constitutes a challenge today and tomorrow.

Key words: multidrug-resistant bacteria, eco-epidemiology, multilevel modelling, time series analysis, PCR, PFGE, MLST.